

THESIS

MUNICH

1966

Versuche zum Nachweis und zur
Anreicherung der Senkungslipase
aus menschlichem Serum

FRANZ ADLKOFER

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASEEN DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Direktor : Prof. Dr. A. Butenandt

Versuche zum Nachweis und zur Anreicherung der
Senkungslipase aus menschlichem Serum

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Adlkofer

aus

Attenzell

1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.Dr.G.Ruhenstroth-Bauer

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr.A.Butenandt

Dekan: Prof.Dr.R.Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1966

Druck: Mikrokopie GmbH . München . Bruderstr. 9

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1963 bis November 1965 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung mit Übersicht über die bei der beschleunigten Blutkörperchensenkung beteiligten Faktoren	1
Methodik	3
Ergebnisse	
A) Vorversuche	17
B) Versuche zur Anreicherung des Enzyms	23
C) Versuche zur Charakterisierung des Enzyms	41
Besprechung	45
Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	51

Versuche zum Nachweis und zur Anreicherung der Senkungslipase aus menschlichem Serum

Die beschleunigte Blutkörperchensenkung, deren Geschichte in die Frühzeit der europäischen Medizin zurückreicht, wurde ausführlich erst in der Mitte des 19. Jahrhunderts von Nasse (1) und etwas später von Hewson (2) beschrieben. Sie ist in einer Veränderung des Plasmas begründet; denn die Erythrozytenrezeptoren, die die entsprechenden Plasmafaktoren binden, unterscheiden sich bei gesunden Menschen und Kranken mit einer beschleunigten Senkung nicht (3). Die Plasmafaktoren solcher Patienten sind spezifische Proteine, die als Agglomerine bezeichnet wurden (4). Sie verursachen im Verein mit einem unspezifischen Protein, dem Supplement (5), Erythrozytenagglomerate, die im Senkungsansatz beschleunigt sedimentieren. Zu den Agglomerinen zählen Fibrinogen (6), Coeruloplasmin, γ -S-X-Globulin, Haptoglobin (7) und wahrscheinlich noch weitere nicht charakterisierte Plasmaproteine.

Blutplasma, das von Patienten mit beschleunigter Blutkörperchensenkung stammt, verliert seine Senkungsbeschleunigung, wenn es mehrere Stunden bei 37° aufbewahrt wird. Ähnlich verhält sich das schon physiologisch beschleunigt senkende Pferdeplasma. Bereits 1921 hat Fåhræus (3) diesen Versuch, der seither vielfache Bestätigung (8,9) fand, beschrieben und zu deuten versucht. Er vermutete, daß eine im Serum vorhandene Lipase Lysolecithin aus Lecithin freisetzt, wodurch die beschleunigte Senkung aufgehoben wird. Folgende Gründe sprechen nach seinen Ergebnissen für einen solchen enzymatischen Prozeß: Der Wirkungseintritt ist

1. temperaturabhängig. Das Temperaturoptimum liegt bei 42° . Eine irreversible Schädigung des Systems tritt ein, wenn das Plasma kurz auf 52° erhitzt wird.
2. pH-abhängig. Das Wirkungsmaximum liegt im schwach alkalischen Bereich.

3. zu verhindern durch einen typischen Lipaseblocker (10).

Ruhenstroth-Bauer (9) bestätigte und erweiterte die Befunde von Fahraeus. Er bezeichnet die Substanz, die in das Zusammenspiel von Erythrozytenoberflächenrezeptoren und Plasmafaktoren eingreift und dabei die beschleunigte Senkung aufhebt, als Senkungsinhibitor. Dieser muß aus einem Proinhibitor freigesetzt werden, der in normalem und physiologisch hochsenkendem Plasma vorhanden ist.

Neue Untersuchungen zur chemischen Natur des Inhibitors haben die Vermutung von Fahraeus bestätigt: Der Inhibitor ist mit dem Lysolecithin identisch (11). Nach seiner Entstehung bildet er mit Albumin einen relativ festen Komplex (12,13,14). Da die Zugabe von immunoelektrophoretisch reinem Albumin zur Aufhebung der Inhibitorwirkung in inhibitorhaltigen Seren (11,15) führt, kann eine Konkurrenzreaktion zwischen Albumin und Lysolecithinrezeptor an der Erythrozytenoberfläche angenommen werden; der Inhibitor scheint dadurch der Reaktion, die die Hemmung der beschleunigten Senkung verursacht, entzogen zu werden.

Die chemische Charakterisierung des Proinhibitors hat gezeigt, daß er zu den α_1 -Lipoproteiden gehört (16). Wenn nämlich aus dem hochsenkendem Plasma die α_2 - und β -, aber nicht die α_1 -Lipoproteide entfernt sind, läuft die Entstehung des Inhibitors ungestört ab.

Über die nähere Natur des Enzyms liegen Untersuchungen vor, die auf eine gewisse Spezifität hindeuten. Folgendes ist bekannt:

1. Das Substrat ist ein α_1 -Lipoproteid.
2. Das Produkt ist Lysolecithin.
3. Das Enzym wird durch Metallionen (Hg, Cd, Zn, Cu) (17), Diisopropylfluorphosphat (17), Physostigmin (17) und Chinin (10) blockiert und
4. durch Gallensäuren aktiviert (4).
5. Eine Lipoproteidlipase aus Rinderherz und eine Lipase aus Sojabohnen können aus dem Proinhibitor den Inhibitor nicht

freisetzen (9).

In vorliegender Arbeit wird über Versuche zur Anreicherung des Enzyms aus menschlichem Serum berichtet. Im ersten Teil werden die Methoden beschrieben, die zur Aufarbeitung des Serums und zur Austestung der einzelnen Fraktionen herangezogen wurden. Im zweiten Teil, der in Vorversuche (A), in Versuche zur Anreicherung (B) und in Versuche zur Charakterisierung des Enzyms (C) gegliedert ist, werden die Ergebnisse dargestellt und besprochen

Methodik

1. Herkunft der Substanzen und Geräte:

Substanzen:

Dextran: Knoll AG, (Ludwigshafen); Na_2HCO_3 p.a., Ammoniak 25 %ig, KH_2PO_4 p.a., Na-acetat p.a.: Riedel-De-Haen AG (Seelze-Hannover); EDTA-Dinatriumsalz, Folin-Reagens, Na_2HPO_4 , Na-Veronal: Merck AG (Darmstadt); Na_2CO_3 : reinst; KBr, Ammoniumsulfat: p.a.; Cialit: Asid-Institut GmbH (München-Lohhof); DEAE-Cellulose: Serva (Heidelberg), Kapazität 0,84, Reinheit p.a.; Phosphorsäure: 85%ige Lösung; Tris(2-Amino-2-hydro-methyl-propandiol-(1,3)): Light (London); Sephadex G 200: Pharmacia (Uppsala) Schweden; Agar; Immunseren: Behringwerke AG (Marburg); RBS-25-Konzentrat: C. Roth (Karlsruhe); Haptoglobin: Centre National de Transfusion Sanguine (Paris).

Geräte:

Ultrazentrifuge L 50 (Rotor Nr. 30, Titan-Rotor Nr. 50,) Spektralphotometer DU: Beckmann (München); Christ-Zentrifuge UJ 3: (Osterode/Harz); Servall-Zentrifuge SS 1A: Serva Heidelberg; Ultrafilter: Membranfiltergesellschaft (Göttingen); Dialyseschläuche: Visking Company (Chicago).

2. Reinigung der Glasgeräte:

Die Glaswaren wurden nach dem Waschen etwa 12 Stunden in eine 3%ige RBS-25-Lösung gegeben, anschließend 8 Stunden gewässert und im Trockenschrank bei 200° getrocknet. Die Senkungsröhrchen wurden 12 Stunden in Chromschwefelsäure gestellt und dann wie die anderen Glassachen behandelt.

3. Blutgewinnung:

Je nach Verwehdungszweck wurden venöses Citratblut (Blut: 3,8%iger Natriumcitratlösung = 4:1) von gesunden Spendern der Blutgruppe O oder Nativblut von gesunden Spendern beliebiger Blutgruppen verwendet.

4. Gewinnung von Mischserum:

Das Nativblut wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 1880 g (Christ-Zentrifuge, Modell UJ 3) in Serum und zelluläre Bestandteile aufgetrennt. Das überstehende Serum wurde abpipettiert und mit dem anderer Spender gemischt. Stärker lipämische Seren wurden nicht verwendet.

5. Inkubation:

Mischserum und die daraus gewonnenen enzym- und proinhibitorhaltigen Fraktionen wurden im Brutschrank, wenn nicht anders angegeben, 7 Stunden bei 37° gehalten.

6. Senkungstest:

Die Senkungsaktivität normalsenkender Seren wird durch Zusatz von Dextran erhöht (7,18,19). Wie beim pathologisch beschleunigt senkendem Serum kann auch in diesem Modellansatz die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) durch vorausgehende Wärmebehandlung stark herabgesetzt oder aufgehoben werden.

Die Erythrozytenkonzentration im Senkungsansatz beeinflusst sowohl die Senkungsbeschleunigung (20) als auch deren Hemmung durch Inkubation des Serumanteils. Deswegen wurden genormte Senkungsansätze hergestellt. Diese enthielten:

a) 0,7 ml Mischserum oder das gleiche Volumen einer 0,9%igen Kochsalzlösung mit einer Serumfraktion mit oder ohne Proinhibitor.

b) 0,3 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung mit 30 mg Dextran (mittleres Molekulargewicht 96000) (7).

Dazu wurde in physiologischer Kochsalzlösung eine 10%ige Dextranlösung frisch bereitet und bis zur Verwendung maximal 10 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

c) 0,5 ml gepackter dreimal gewaschener Erythrozyten eines Spenders der Blutgruppe O.

Venöses Citratblut wurde 10 Minuten bei 1880 g zentrifugiert (Christ-Zentrifuge, Modell UJ 3). Das überstehende Plasma wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Erythrozyten wurden mit 0,9%iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt und wie beschrieben erneut zentrifugiert. Um möglichst alle Plasmareste zu entfernen, wurde die Waschung mit 0,9%iger Kochsalzlösung noch zweimal wiederholt. Unmittelbar nach der vierten Zentrifugation wurden die gepackten Erythrozyten dem Senkungsansatz zugesetzt.

Die Senkungsansätze wurden vor dem Aufziehen der Senkungs-röhrchen sorgfältig gemischt.

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit wurde nach der Methode von Westergren bestimmt (21). Das in den Senkungsansätzen hergestellte Gemisch wurde in Glasröhrchen von $2,5 \pm 0,1$ mm Durchmesser 200 mm hoch aufgezogen. Nach 1/2, 1, 2 Stunden und, wenn erforderlich auch später, wurde die Strecke abgelesen, die sich die Erythrozytensäule gesenkt hatte. Als Maß der Inkubationswirkung wurden die BKS der Senkungsansätze, die wärmeinaktiviertes Mischserum oder eine Fraktion daraus enthielten, mit der BKS von Kontrollansätzen verglichen.

Diese wurden hergestellt für

- a) alle Senkungsansätze mit wärmeinaktiviertem Mischserum,
 - b) alle Senkungsansätze mit Serumfraktionen, deren Proinhibitorgehalt festgestellt werden sollte, und
 - c) alle Senkungsansätze mit proinhibitorfreien Serumfraktionen, deren Enzymgehalt ausgetestet werden sollte und denen dazu vor der Inkubation der Proinhibitor zugesetzt werden mußte.
- Im Kontrollansatz zu a) und b) wurden das Mischserum bzw. die Serumfraktionen bei 4° aufbewahrt und im Kontrollansatz zu c) wurden Serumfraktion und Lipoproteidfraktion (Proinhibitor) nach der getrennten Inkubation zusammengegeben.

Wenn die Senkung im Kontrollansatz 50 mm erreicht hatte, wurde gleichzeitig im dazu gehörenden Testansatz der Senkungswert in Millimetern ("50 mm-Wert") abgelesen. Daraus konnte die prozentuale Hemmung der BKS in den Testansätzen berechnet werden.

7. Dialyse:

Alle Proteinlösungen, die im Senkungsansatz ausgetestet werden sollten, wurden zur Einstellung der physiologischen Osmolarität vor der Inkubation 18 - 20 Stunden bei 4° gegen eine Außenphase dialysiert, die 0,9% Kochsalz enthielt und mit 2,5 mg% Natriumbikarbonat auf pH 7,2 eingestellt worden war. Die Lipoproteidfraction mit dem Proinhibitor wurde ebenfalls 20 Stunden bei 4° gegen eine isotonische Kochsalzlösung dialysiert, die 0,1% Dinatriumäthylendiamintetraacetat (22,16) enthielt und mit 1n Natronlauge auf pH 7,4 gebracht worden war.

Das Volumen der Außenphase betrug in jedem Fall mindestens 40-fache des Volumens der Fraktion, die dialysiert wurde.

8. Die Eiweißbestimmung wurde nach Folin-Ciocalteu durchgeführt (23).

Reagentien:

- A. 2% Na_2CO_3 in 0,1n NaOH
- B. 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1% Na-Citrat-Lösung
- C. 1 ml der Lösung B gemischt mit 50 ml der Lösung A
- D. Folin-Ciocalteu-Reagens. Das Reagens wird mit 1n NaOH und Phenolphthalein als Indikator titriert und mit Wasser so verdünnt, daß eine 1n Lösung entstand (1 Vol. Reagens Merck + 2 Vol. Wasser).

Eine Probe, die 10 - 100 μg Protein enthält, wird mit 0,9% Kochsalzlösung auf 1,0 ml aufgefüllt, mit 5,0 ml Lösung C versetzt und bei Raumtemperatur abgestellt. Nach 10 Minuten werden 0,5 ml Reagens D hinzupipettiert. Die Mischung wird sorgfältig geschüttelt. Nach 30 Minuten bis längstens 2 Stunden wird die Extinktion bei 750 $\mu\mu$ gemessen (Beckmann, Photometer). Der Proteingehalt der Proben wird aus der Eichkurve abgelesen, die dadurch entsteht, daß in einem Koordinatensystem auf der Abszisse die Menge von 10,50 und 100 μg Albumin und auf der

Ordinate die dazugehörige Extinktion eingezeichnet wird.

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben werden ihre Extinktionswerte mit den Extinktionswerten von Lösungen verglichen, die wie die Proben behandelt werden, aber im Gegensatz zu ihnen eine definierte Menge, nämlich 10, 50 und 100 μg Albumin enthalten.

In 10 ml physiologischer Kochsalzlösung werden 10 mg Albumin gelöst. Volumina von 0,5 ml mit 500 μg werden abgenommen, eingefroren und in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Bei Bedarf werden 0,5 ml aufgetaut und mit Wasser 1:10 verdünnt, so daß 0,1 ml 10 μg Albumin enthält.

9. Gewinnung einer Lipoproteidrohfraktion (LP-R) und eines lipoproteidfreien Unterstandes (U) durch Flotation von Mischserum bei erhöhter Dichte in der Ultrazentrifuge (24,25, 26,16).

Mischserum wurde mit Kaliumbromid auf die Dichte 1,200 g/ml eingestellt (48,586 g KBr/170 ml Mischserum). Die Menge Kaliumbromid, die dazu nötig war, wurde nach der Formel (27) berechnet:

$$A \cdot Y + B \cdot Z = (A + B) \cdot X$$

A = Volumen einer Lösung der Dichte Y

B = Volumen einer Lösung der Dichte Z

X = gesuchte Dichte

Die mittlere Dichte des Mischserums ohne Berücksichtigung der Proteine beträgt 1,006 g/ml (28). Dieser Dichte entspricht die einer Modelllösung, die im Liter H_2O 11,044 g Kochsalz enthält. 50 g Kaliumbromid werden mit dieser Modelllösung auf 100 ml aufgefüllt. Die Dichte dieser Lösung beträgt, pyknometrisch festgestellt, 1,3455 g/ml. Wenn Mischserum damit auf die gewünschte Dichte von 1,200 g/ml gebracht wird, läßt sich auch die Kaliumbromidmenge berechnen, die im Mischserum gelöst sein muß (16). Durch Zugabe von Kaliumbromid in kristalliner Form wird eine Verminderung der Proteinkonzentration verhindert, wie sie eintrete, wenn eine Kaliumbromidlösung zur Dichteerhöhung verwendet würde.

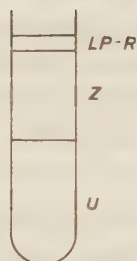
Um das Mischserum im Laufe der Aufarbeitung vor Verunreinigungen mit Bakterien zu schützen, wurde Cialit im Verhältnis 1 : 10000 zugesetzt. Anschließend wurde 20 Stunden im Rotor Nr. 40 mit 40000 U/min bei 5 - 10° zentrifugiert.

Je Röhrchen wurde entnommen:

0,8-1,0 ml Lipoproteidrohfraktion=LP-R

4,5-5,0 ml Zwischenzone = Z

6,5-7,0 ml Unterstand = U



Alle Fraktionen wurden im Senkungstest auf ihren Proinhibitor- bzw. Enzymgehalt untersucht.

10. Präparative Darstellung der α_1 -Lipoproteide und eines α_1 -lipoproteidfreien Unterstandes U durch Ultrazentrifugation (Siehe Schema Seite 11).

Mischserum wurde mit Kaliumbromid auf die Dichte 1,250 g/ml gebracht (170,8 g KBr/475 ml Mischserum), mit Cialit 1:10000 versetzt und im Rotor Nr. 30 20 Stunden mit 30000 U/min bei 5 - 10° zentrifugiert.

Je Röhrchen wurde entnommen:

12 ml Flotationsprodukt = A

14 ml mittlerer Unterstand = B

11 ml unterer Unterstand = C



C wurde bis zur weiteren Verwendung maximal 4 Tage im Eisbad aufbewahrt.

Aufarbeitung von B:

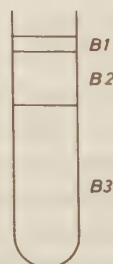
B wurde ohne Dichteveränderung im Titan-Rotor Nr. 50 mit 50000 U/min 18 Stunden bei 5 - 10° zentrifugiert.

Je Röhrchen wurde entnommen:

0,7-0,9 ml α_1 -Lipoproteidrohfraktion = B1

2,5-3,5 ml Zwischenzone = B2

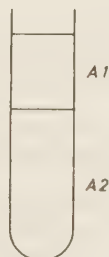
8,0-9,0 ml Unterstand = B3



B1 wurde mit Aqua bidest. auf die Dichte 1,200 g/ml gebracht und zusammen mit der α_1 -Lipoproteidrohfraktion aus A weiterverarbeitet. B3 wurde wie C aufbewahrt. B2 wurde verworfen.

Aufarbeitung von A:

A wurde gegen 10 Liter einer Außenphase, die 0,1% EDTA-Dinatriumsalz enthielt und mit 1n Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt worden war, 22 Stunden bei 4° dialysiert. Die Dichte der Außenphase wurde pyknometrisch bestimmt. Sie betrug 1,003 g/ml. Ihr gleichgesetzt wurde die Dichte des dialysierten A, wobei dessen hochmolekulare Bestandteile unberücksichtigt blieben. A wurde mit Kaliumbromid der Dichte 1,374 g/ml mit Hilfe der angeführten Formel auf die Dichte 1,063 g/ml gebracht und im Rotor-Nr. 50 mit 50000 U/min 8 Stunden bei 5 - 10° zentrifugiert.



Je Röhrchen wurde entnommen:

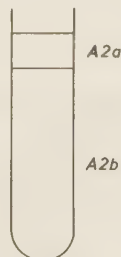
4,0 ml α_2 - und β -Lipoproteide und die Chylomikronen = A1
9,5 ml Unterstand = A2

A1 wurde verworfen. Dem A2 wurde soviel Kaliumbromid zugesetzt, daß die Dichte 1,200 g/ml resultierte.

A2 der Dichte 1,200 g/ml wurde 18 Stunden im Titan-Rotor Nr. 50 mit 50000 U/min bei 5 - 10° zentrifugiert.

Je Röhrchen wurde entnommen:

1,5-2,0 ml α_1 -Lipoproteidrohfraktion=A2a
11,5-12,0 ml Unterstand =A2b



A2a wurde ohne Dichteveränderung zur Anreicherung und Reinigung der α_1 -Lipoproteide in einem Lauf mit A2b, das mit Kaliumbromidlösung der Dichte 1,374 g/ml auf die Dichte

1,250 g/ml gebracht worden war, erneut 18 Stunden im Titan-Rotor Nr. 50 mit 50000 U/min bei $6 - 10^{\circ}$ zentrifugiert.

Entnommen wurde aus den Röhrchen:

a) mit A2a

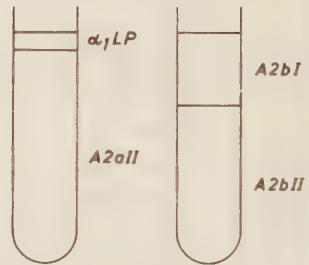
1,0 ml γ -Lipoproteide = A2aI oder
 γ -LP

12,5 ml Unterstand = A2aII

b) mit A2b

3,5-4,0 ml Überstand = A2bI

8,5-9,0 ml Unterstand = A2bII



A2aI wurde bis zum Gebrauch bei 4° aufbewahrt. A2bII wurde mit B3 und C weiterverarbeitet. A2aII und A2bI wurden verworfen.

Das Schema Seite 11 skizziert die Aufarbeitung von Mischserum zu γ -Lipoproteiden und lipoproteidfreiem Unterstand.

11. Einengung einer Proteinlösung

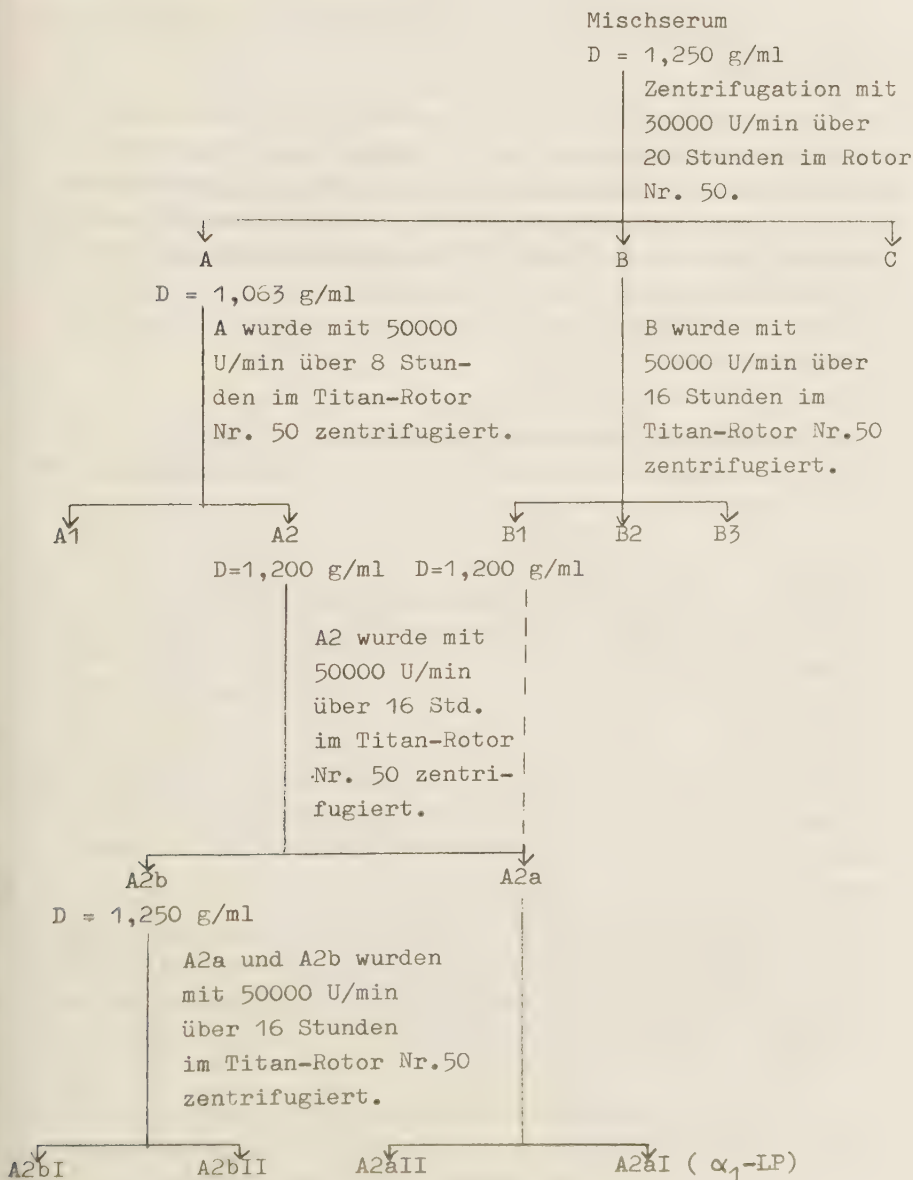
a) mit Druckdialyse:

Das Lösungswasser wurde unter einem Druck von 20 atm. durch ein Ultrafilter (Membranfiltergesellschaft) gepreßt, was zu einer Konzentrationserhöhung der Proteine in der Druckkammer führte. Die Methode wurde nur verwendet, wenn größere Mengen einer Proteinlösung verarbeitet werden mußten. Als Nachteil erwies sich der hohe Proteinverlust durch Haftung der Proteine am Ultrafilter.

b) durch Ultrafiltration im Dialyseschlauch (Typ Visking 18/32) (29):

Ein oder mehrere Dialyseschläuche wurden mit der Proteinlösung gefüllt und an den Enden verknotet, daß keine Luftblasen festzustellen waren. Auf eine Glasplatte wurde Filterpapier und darauf die Dialyseschläuche gelegt. Diese wurden mit Filterpapier zugedeckt. Darüber wurde eine zweite Glasplatte gelegt, die mit einem Gewicht beschwert werden konnte. In Abhängigkeit vom Druck des Gewichtes und vom Sog der Kapillaren im Filterpapier strömte in verhältnismäßig kurzer Zeit soviel

Schema der Aufarbeitung von Mischserum zur α_1 -Lipoproteidfraktion α_1 -LP und den lipoproteidfreien Unterständen A2bII, B3 und C.



Lösungswasser aus den Dialyseschläuchen, daß die Proteinkonzentration erhöht wurde. Es trat kein Proteinverlust auf.

Die beiden Methoden wurden im Kälteraum bei 4° angewandt.

12. Aussalzung der Unterstände A2bII, B3 und C mit Ammoniumsulfatlösung:

Die Unterstände A2bII, B3 und C wurden 20 Stunden bei 4° gegen eine Außenphase mit 0,9% Kochsalz und 2,5 mg% Natriumbikarbonat dialysiert. Anschließend wurden sie mit 0,9%iger Kochsalzlösung so verdünnt, daß der Proteingehalt 5% betrug. Zur Aussalzung wurde eine 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, die mit 25%igem Ammoniak auf pH 7,4 eingestellt worden war, bei 4° unter ständigem Rühren auf einem Magnetprüher tropfenweise hinzupipettiert.

Das Volumen der 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, das zur Erreichung einer gewünschten Ammoniumsulfatkonzentration zur Proteinlösung hinzugegeben werden mußte, wurde nach folgender Formel berechnet (30,12):

$$Y = 100 (A - B) (C - A), \text{ wobei}$$

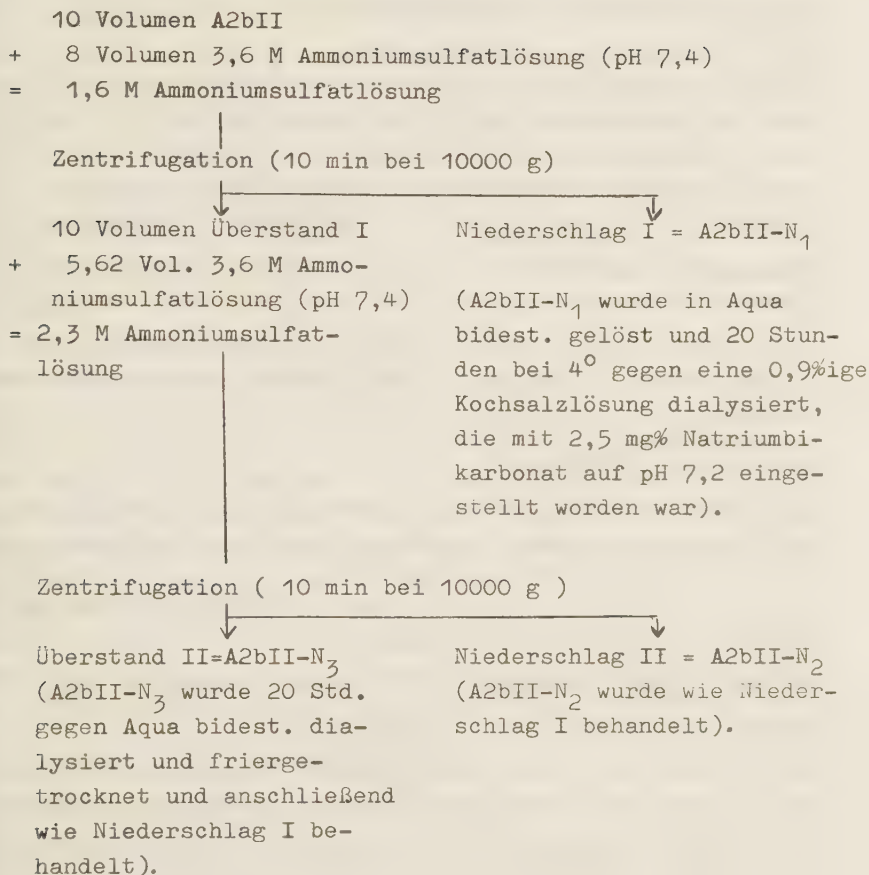
Y = Volumen der Ammoniumsulfatlösung der Sättigung C, das zu 100 ml Proteinlösung der Sättigung B gegeben werden muß, um die Sättigung A zu erhalten.

Die Sättigung in Prozent wurde in die molare Konzentration umgerechnet.

Die Proteinlösung stand nach Zugabe der Ammoniumsulfatlösung 3 Stunden bei 4°, bevor sie durch Zentrifugation mit der Servall-Zentrifuge in Überstand und Niederschlag getrennt wurde.

Wie A2bII wurden auch B3 und C ausgesalzen. Die Fraktionen B3-N₁, B3-N₂, B3-N₃, C-N₁, C-N₂ und C-N₃ wurden wie A2bII-N₁, A2bII-N₂ und A2bII-N₃ im Senkungstest auf ihren Enzymgehalt untersucht.

Schema der Aussalzung:



13. Fraktionierung von A2bII-N₂ und B3-N₂ über DEAE-Cellulose:

DEAE-Cellulose wurde in Aqua bidest. aufgeschwemmt und 2 Tage bei 4° aufbewahrt. Mehrmals wurde das überstehende Wasser mit feineren Partikeln, die sich nicht mit der Hauptmasse der DEAE-Cellulose abgesetzt hatten, abgegossen und durch frisches ersetzt.

Anschließend wurde die DEAE-Cellulose nacheinander (31) mit 0,1 n Salzsäure, bidest. Wasser, 0,1 n Natronlauge und bidest. Wasser bis zum neutralen pH gewaschen. Der Vorgang wurde

dreimal wiederholt.

Füllung der Säule mit DEAE-Cellulose (Säulendimension 2,2 x 40,0 cm):

Nach dem Waschen wurde die DEAE-Cellulose mehrmals in Startpuffer aufgeschwemmt, mit Hilfe einer Saugflasche an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und dann auf einmal in die Säule gefüllt. Nach dem Absetzen der breiigen Masse wurde die Säule noch 20 Stunden bei 4° mit Startpuffer durchgespült.

Auftragung der Substanz (5,0-6,0 ml der 4-5%igen Proteinlösung):

A2bII-N₂ wurde zusammen mit B3-N₂ gegen Startpuffer 20 Stunden dialysiert und dann mit einer Pipette auf die Säule aufgetragen.

Elution der Proteine:

Die Chromatographie wurde mit einem Gradienten steigender Molarität bei gleichem pH-Wert durchgeführt. Verbraucht wurden 800 ml Startpuffer und 400 ml Grenzpuffer. Die Ausfließgeschwindigkeit, die vom Druck der angeschlossenen Sigma-pumpe abhängt, betrug 65 ml/Std.

Das Eluat wurde nach Einengung im Senkungsansatz ausgetestet.

Herstellung von Start- und Grenzpuffer:

Startpuffer: In 2 Liter einer 0,005 M Phosphorsäure wurde 2,8 g Tris gelöst, so daß ein pH-Wert von 7,5 resultierte.

Grenzpuffer: In einem Liter einer 0,4 M Phosphorsäure wurde 104,7 g Tris gelöst, so daß ebenfalls ein pH-Wert von 7,5 zustandekam.

0,4 M Phosphorsäure: 46,117 g einer 85%igen Phosphorsäure wurde mit bidest. Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

14. Fraktionierung über Sephadex G 200 (32):

Trockengel wurde zum Aufquellen mit Aqua bidest. versetzt und 3 Tage bei 4° abgestellt. In dieser Zeit wurde mehrmals umgerührt und dekantiert.

Füllung der Säule mit Sephadex G 200: (Säulendimension 5,0 x 80,0 cm)

Nach dem Abgießen wurde der homogene Brei mit 0,02 M Phosphatpuffer von pH 7,4 aufgeschwemmt und in einem Guß in die Säule gefüllt. Immer wenn sich das Gel abgesetzt hatte und genügend Puffer abgelaufen war, wurde nachgegossen, so daß die Säule innerhalb 10 Stunden gefüllt war. Sie wurde anschließend 24 Stunden bei 4° mit 0,02 M Phosphatpuffer durchgespült.

Auftragung der Substanz (10-15 ml einer 4-6%igen Proteinlösung):

N₂ aus A2bII, B3 bzw. C wurde 20 Stunden gegen 0,02 M Phosphatpuffer dialysiert und dann auf die Säule aufgetragen. Um ein zu ungleichmäßiges Einsickern in das Gel zu verhindern, wurde vor der Proteinlösung 1 ml einer 20%igen Succroslösung auf die Säule gegeben. Unmittelbar darnach wurde N₂ aufgetragen. Verwendet wurde dazu eine Rekordspritze mit einer Kanüle, an der ein dünner PVC-Schlauch befestigt worden war.

Elution der Proteine:

Zur Elution wurde 0,02 M Phosphatpuffer verwendet. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug 14-18 ml/Std., das Volumen der einzelnen Fraktionen zwischen 7 und 9 ml.

Herstellung der Extinktionskurve:

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bei 280 ~~mu~~ gemessen. In einem Koordinatensystem wurden auf der Abszisse die Nummern der einzelnen Fraktionen und auf der Ordinate die Extinktionswerte dieser Fraktionen eingetragen. Zusammengehörige Fraktionen wurden vereinigt und friertrocknet.

Herstellung eines 0,02 M Phosphatpuffers von pH 7,4:

1000 ml einer Lösung mit 17,8 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) und 221 ml einer Lösung mit 13,609 g Kaliumdihydrogenphosphat ergeben gemischt einen 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,4. Dieser Puffer wurde mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:5 verdünnt.

15.. Immunelektrophorese (33,34):

Reagentien:

a) Puffer:

- α) Stammlösung pH 8,2: 117,68 g Na-Veronal und 77,68 g Natriumacetat ($\times 3 \text{ H}_2\text{O}$) wurden in 1 Liter Aqua bidest. gelöst. Zugesezt wurden außerdem 100 mg Cialit.
 - β) Stampfpuffer: Zu 200 ml Stammlösung wurden 1560 ml Aqua bidest. und 280 ml n/10 HCl zugegeben.
 - γ) Puffer zur Kammerfüllung: 2000 ml Stampfpuffer und 1000 ml Aqua bidest. wurden zusammengegeben.
 - δ) Puffer zur Herstellung der Agarlösung: Stampfpuffer und Aqua bidest. wurden im Verhältnis 1:2 gemischt.
- b) Agar: 2 g Reinagar wurden mit 100 ml Puffer im siedenden Wasserbad solange erhitzt, bis alle Luftblasen hochgestiegen waren.
- c) Antigene: 0,001 ml Mischserum, A2bII, B3, C, N₂ aus diesen Fraktionen und F, ferner α₁-Lipoproteide.
- d) Antiseren: Antihumanserum vom Kaninchen, Anti-α₁-Lipoproteidserum vom Kaninchen; je Objektträger wurden 0,07 ml aufgetragen.
- e) Zum Färben wurde eine 0,4%ige Lösung von Azokarmin G in Methanol/Eisessig (im Verhältnis 9:1) verwendet.

Methode:

Auf gereinigte Objektträger wurde 2,2 ml Agarlösung nach Erhitzen im Wasserbad aufgetragen. Nach 10 Minuten wurden mit einem Schneideapparat Löcher und Schlitze vorgestanz und der Agar innerhalb der Löcher mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Mit einer Kapillare wurde das Antigen in die Löcher gegeben. Die Objektträger wurden in die Elektrophoresekammer gebracht. An ihren Schmalseiten wurde mit pufferdurchtränkten Filterpapierstreifen die Verbindung zum Puffer in der Kammer hergestellt. Die Elektrophorese dauerte 90 Minuten, wobei die Stromstärke von 4,5 mA/Objektträger konstant gehalten wurde.

Nach der Elektrophorese wurde der vorgestanzte Schlitz ausgehoben und mit Immunserum gefüllt. Zur Diffusion der Immunsereen wurden die Objektträger 24 - 36 Stunden in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Um überschüssiges Immunserum und auch Puffersalze zu entfernen, wurden die Objektträger in eine Petrischale mit physiologischer Kochsalzlösung gebracht und dort 12 Stunden aufbewahrt. Unmittelbar nach dem Waschen wurden die Präzipitationslinien angefärbt. Dazu wurden die Objektträger 15 - 20 Minuten in die Farblösung gebracht. Anschließend wurde mit 10%iger Essigsäure entfärbt.

Ergebnisse

A. Vorversuche:

Es wurde der Einfluß der Inkubation auf Mischserum festgestellt. Ferner wurde geprüft, wie sich Mischserum, das vor der Inkubation verschieden behandelt und dem verschiedene Substanzen zugesetzt worden waren, im Senkungstest verhält.

1. Versuch: Abhängigkeit der Inhibitorwirkung von der Dauer der Inkubation.

Mischserum (MS) wurde aus dem Blut von 12 Spendern beliebiger Blutgruppen gewonnen. Proben mit 0,7 ml wurden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 22 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Senkungsansätze und der Kontrollansatz (K), dessen Mischserum bei 4° aufbewahrt worden war, wurden nach Methode 6 hergestellt. Abgelesen wurden die Senkungswerte nach 1 und 2 Stunden, ferner zu dem Zeitpunkt, als der Kontrollansatz 50 mm erreicht hatte (50 mm-Wert).

Die Werte der Tabelle 1 wurden in 3 weiteren Versuchen mit

demselben Mischserum bestätigt. Die Schwankungen betrugen beim 2-Stunden-Senkungswert weniger als ± 3 mm.

Mischserum (MS) mit In- kubationszeit in Stunden	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
MS-K	50/98	50	-
MS-1	39/85	39	22
MS-2	31/74	31	38
MS-3	18/47	18	64
MS-4	8/20	8	84
MS-5	5/13	5	90
MS-6	2/ 7	2	96
MS-7	1/ 4	1	98
MS-8	0/ 2	0	100
MS-22	0/ 0	0	100

Tab. 1: Die Abhängigkeit der Inhibitorwirkung eines Mischserums von der Dauer der Inkubation. (Die Kontrollansätze sind in allen Tabellen mit K bezeichnet).

In einem Koordinatensystem wurde auf der Abszisse die Inkubationszeit und auf der Ordinate die Hemmung in % aufgetragen (Siehe Abb. 6, Seite 41).

Ergebnis: Die BKS in Senkungsansätzen mit gleichen Mengen an inkubiertem Mischserum ist abhängig von der Dauer der Inkubation des Mischserums. Je länger die Temperatur von 37° auf das Proinhibitor-Enzym-System einwirkt, desto stärker wird die BKS durch den vermehrt freigesetzten Inhibitor verlangsamt.

2. Versuch: Die Abhängigkeit der Inhibitorwirkung von der Konzentration des Mischserums im Senkungsansatz.

Der Proteingehalt eines Mischserum aus dem Blut von 10 gesunden Spendern beliebiger Blutgruppen wurde mit 7,2% festgestellt. Proben mit 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 und 0,1 ml

wurden abgenommen, mit Ausnahme der 1. Probe mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf 0,7 ml aufgefüllt und 7 Stunden inkubiert. Die Senkungsansätze und die Kontrollansätze, deren Mischserum nicht inkubiert worden war, wurden nach Methode 6 hergestellt. Die Werte der Tabelle 2 sind Mittelwerte aus jeweils 3 gleichen Senkungsansätzen. Die Streuung betrug in allen Fällen wenige Millimeter.

Mischserum (ml/Senkungs- ansatz)	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
0,1-K	73/112	50	
0,1	65/108	44	12
0,2-K	73/113	50	-
0,2	56/ 98	39	22
0,3-K	57/103	50	-
0,3	37/ 80	33	34
0,4-K	60/102	50	-
0,4	32/ 66	25	50
0,5-K	59/100	50	-
0,5	22/ 51	18	64
0,6-K	55/108	50	-
0,6	14/ 31	13	74
0,7-K	58/100	50	-
0,7	10/ 24	8	84

Tab. 2: Die Abhängigkeit der Inhibitorwirkung eines inkubierten Mischserums von seiner Konzentration im Senkungsansatz.

In einem Koordinatensystem wurden auf der Abszisse die Menge des inkubierten Mischserums in mg und auf der Ordinate die Hemmung der BKS in % aufgetragen.

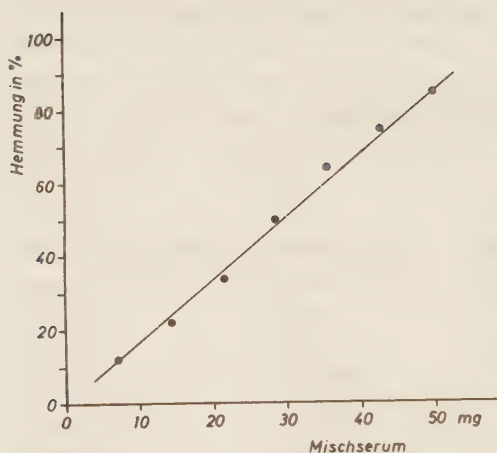


Abb. 1: Die Abhängigkeit der Hemmung der Blutkörperchensenkung von der Konzentration des inkubierten Mischserums im Senkungsansatz.

Ergebnis: Die BKS in Senkungsansätzen mit steigenden Mengen an inkubiertem Mischserum ist bei gleicher Inkubationsdauer von der Menge des eingesetzten Mischserums abhängig. Die Inhibitorwirkung ist in dem erfaßten Bereich direkt proportional der Menge des inkubierten Mischserums im Senkungsansatz.

3. Versuch: Einfluß von Haptoglobulin im inkubierten Mischserum auf die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit.

Mischserum, in dem in 1 ml 20 mg Haptoglobulin gelöst waren, wurde in Proben zu 0,1, 0,3, 0,5 und 0,7 ml unterteilt. Diese wurden mit Mischserum, dem kein Haptoglobulin zugesetzt war, soweit möglich, auf 0,7 ml aufgefüllt und inkubiert. Zur Kontrolle standen Proben bei 4°. Senkungsansätze und Kontrollansätze K wurden nach Methode 6 zusammengestellt.

Haptoglobulin im Senkungsansatz (mg)	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
14-K	77/115	50	-
14	18/ 52	15	70

10-K	51/102	50	-
10	12/ 37	12	76
6-K	47/ 92	50	-
6	5/ 16	5	90
2-K	31/ 73	50	-
2	2/ 6	3	94

Tab. 3: Einfluß von Haptoglobin auf die Blutkörperchensenkung in Ansätzen mit inkubierten und bei 4° aufbewahrttem Mischserum.

Ergebnis: Haptoglobin beschleunigt als Agglomerin die Blutkörperchensenkung in den Senkungsansätzen und in den Kontrollansätzen (7). Die durch die gleiche Menge Inhibitor verursachte Hemmung in den Senkungsansätzen wurde bei steigender Menge an Haptoglobin vermindert.

4. Versuch: Beeinflussung des Proinhibitor-Enzym-Systems im Mischserum

- a) durch Dialyse des Mischserums gegen 0,9%ige Kochsalzlösung, Aqua bidest., 3,6 M Ammoniumsulfatlösung (pH 5,65 und pH 7,4), 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung und 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,4) und
- b) durch Zugabe von Kaliumbromid zum Mischserum:

Mischserum von 10 gesunden Spendern beliebiger Blutgruppen wurden 8 Proben MS₁ bis MS₈ entnommen. Diese wurden wie folgt bei 4° behandelt:

MS₁ wurde aufbewahrt.

MS₂ wurde 40 Stunden gegen eine Außenphase mit 0,9% Kochsalz und 2,5 mg% Natriumbikarbonat dialysiert.

MS₃ wurde 20 Stunden gegen Aqua bidest. und anschließend 20 Stunden wie MS₂ dialysiert.

MS₄ wurde 20 Stunden bei 4° gegen eine 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, dann 12 Stunden gegen eine Außenphase mit 0,9% Kochsalz und 25 mg% Natriumbikarbonat und dann weitere 8 Stunden wie MS₂ dialysiert. Der pH-Wert der Ammoniumsulfatlösung betrug 5,65.

- MS₅ wurde 20 Stunden gegen eine 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, die mit 25%igem Ammoniak auf pH 7,4 gebracht worden war, und dann weitere 20 Stunden wie MS₂ dialysiert.
- MS₆ wurde 20 Stunden gegen eine 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung von pH 4,85 und dann weitere 20 Stunden wie MS₄ dialysiert.
- MS₇ wurde 20 Stunden gegen 0,05 M Phosphatpuffer von pH 7,4 und dann weitere 20 Stunden wie MS₂ dialysiert.
- MS₈ wurde mit KBr auf die Dichte 1,250 g/ml gebracht, 20 Stunden bei 4° aufbewahrt und dann 20 Stunden wie MS₂ dialysiert.

Von MS₁ bis MS₈ wurden nach Herstellung gleicher Proteinkonzentrationen zur Doppelbestimmung je zweimal 0,7 ml 7 Stunden inkubiert. Gleiche Mengen standen diese Zeit als Kontrolle bei 4°. Die Senkungsansätze wurden wie beschrieben hergestellt.

Probe	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
MS ₁ -K	27/62	50	-
MS ₁	4/11	7	86
MS ₂ -K	26/63	50	-
MS ₂	6/14	9	82
MS ₃ -K	25/61	50	-
MS ₃	8/17	13	74
MS ₄ -K	22/54	50	-
MS ₄	11/31	28	44
MS ₅ -K	20/53	50	-
MS ₅	7/19	18	64
MS ₆ -K	25/60	50	-
MS ₆	21/50	43	14
MS ₇ -K	21/55	50	-
MS ₇	8/22	19	62
MS ₈ -K	24/59	50	-
MS ₈	9/20	17	66

Tab. 4: Einfluß der Dialyse gegen 0,9%ige Kochsalzlösung (MS_2), Aqua bidest. (MS_3), Ammoniumsulfatlösung bei verschiedenem pH (MS_4 und MS_5), Phosphatpuffer bei verschiedenem pH (MS_6 und MS_7) und von Kaliumbromid (MS_8) auf das Proinhibitor-Enzym-System im Mischserum.

Ergebnis: Das Proinhibitor-Enzym-System im Mischserum wird durch Dialyse gegen eine Außenphase von niedrigem pH erheblich geschädigt. Geringfügiger beeinflußt wird es

- a) durch Dialyse des Mischserums gegen Aqua bidest.
- b) durch Ausfällung der Serumproteine mit Ammoniumsulfatlösung.
- c) durch Dialyse des Mischserums gegen einen 0,05 M Phosphatpuffer von pH 7,4 und
- d) durch Zugabe von Kaliumbromid zum Mischserum.

Durch Dialyse gegen 0,9%ige Kochsalzlösung wird das System nicht geschädigt.

B. Versuche zur Anreicherung des Enzyms:

Die Vorversuche erlauben nur eine Aussage über das gesamte Proinhibitor-Enzym-System, es geht daraus nicht hervor, ob z.B. in einem sauren Milieu das Enzym oder der Proinhibitor oder beide geschädigt werden. Die nähere Analyse des gesamten Hemmsystems setzt eine Trennung der Komponenten voraus.

5. Versuch: Trennung von Proinhibitor und Enzym durch Ultrazentrifugation.

Der Proinhibitor gehört zur Fraktion der α_1 -Lipoproteide. Durch Flotation von Mischserum bei erhöhter Dichte können diese angereichert werden (16). Gleichzeitig werden alle Proteine, deren Dichte höher ist als die im Mischserum eingestellte, ihrer Sedimentationskonstante entsprechend mehr oder weniger weit abgetrennt. Wenn das Enzym, das aus dem Proinhibitor bei 37° den Inhibitor freisetzt, mit diesen wandert, muß es im Unterstand U nachweisbar sein.

Mischserum aus dem Blut von 5 beliebigen Spendern wurde nach Methode 9 aufgearbeitet. Die Fraktionen U, Z und LP-R wurden dialysiert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes, der bei U 7,5%, bei Z 2,7% und bei LP-R 3,1% betrug, wurden 0,09 ml LP-R, 0,7 ml Z und 0,61 ml U, soweit möglich, mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf 0,7 ml aufgefüllt und 7 Stunden inkubiert. Inkubiert wurden auch 0,61 ml U, zu dem 0,09 ml LP-R gegeben worden waren. Zur Kontrolle für LP-R, Z und U wurden gleiche Ansätze bei 4° aufbewahrt. Um auch für das inkubierte Gemisch aus U und LP-R einen Vergleich zu bekommen, wurden U und LP-R auch getrennt inkubiert und dann nach der Inkubation zusammengegeben.

Fraktion 1/2-, 1-, 1 1/2-, 2-, 2 1/2-Std.- Senkungswert (mm)		50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
LP-R-K	23/52/75/91/100	50	-
LP-R	17/40/60/78/ 88	39	22
Z-K	21/46/70/81/ 97	50	-
Z	4/ 8/15/20/ 39	9	82
U-K	22/47/71/91/103	50	-
U	14/40/63/84/ 98	43	14
U+LP-R-K	20/52/80/102/114	50	-
U+LP-R	2/ 6/12/ 19/ 26	6	88

Tab. 5: Nachweis von Enzym bzw. Proinhibitor in den bei der Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen.

In einem Koordinatensystem wurden auf der Abszisse die Zeit des Senkungsablaufes in Minuten und auf der Ordinate die BKS in mm aufgetragen (Siehe Seite 25, Abb. 2):

Ergebnis: LP-R, allein bei 37° inkubiert, hemmt die BKS nur geringfügig, ein Hinweis dafür, daß es fast frei von Enzym ist. U enthält nur wenig Proinhibitor, aber sicherlich Enzym;

denn aus dem Proinhibitor in LP-R wird bei der Inkubation zusammen mit U Inhibitor freigesetzt, so daß die BKS im Senkungsansatz gehemmt ist.

In Z findet man Enzym und Proinhibitor gemeinsam. Die starke Hemmung der BKS durch Z, das relativ wenig Protein enthält, deutet vielleicht auf eine Anreicherung des Proinhibitor-Enzym-Systems hin.

Eine Reihe ähnlicher Versuche erbrachte dieselben Ergebnisse.

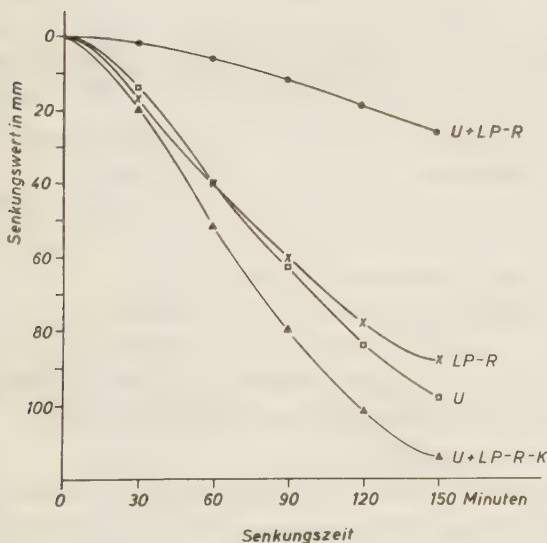


Abb. 2: Vergleich der Hemmung der Blutkörperchen-senkung bei gemeinsamer und getrennter Inkubation von U und LP-R.

In mehreren Fällen gelang es allerdings nicht, nach gemeinsamer Inkubation von LP-R und U die BKS im Senkungsansatz zu hemmen. Für dieses gelegentliche Fehlen der Senkungshemmung bieten sich mehrere Erklärungen an. Es können

- in U die Enzymkonzentration oder
- in LP-R der Proinhibitorgehalt zu niedrig oder
- im gesamten Senkungsansatz die Menge an Albumin (12) oder
- an Agglomerinen (Versuch 3) zu groß sein.

Mehrere Faktoren können auch zusammen wirken.

Um die Möglichkeit unter a) zu prüfen, mußte U oder die Fraktionen aus U stets mit einer genormten Menge an Proinhibitor ausgetestet werden. Da LP-R bei jeder Präparation, abhängig vom Fettgehalt des Mischserums, anders zusammengesetzt ist, war es nötig, die α_1 -Lipoproteide rein darzustellen. Erst dann konnte, wie unter b) angegeben, verhindert werden, daß der Proinhibitorgehalt im Senkungsansatz zu niedrig ist. Gleichzeitig mußte versucht werden, einen Unterstand zu gewinnen, der proinhibitorfrei ist.

Die Inhibitorwirkung im Senkungsansatz kann durch Zugabe von Albumin herabgesetzt bzw. aufgehoben werden (12). Der durch das Enzym freigesetzte Inhibitor wird an Albumin, das in den getesteten Fraktionen in hoher Konzentration vorkommt, gebunden und steht nur teilweise zur Blockierung der BKS zur Verfügung. Auf die Faktoren unter c) und d) wird ausführlicher in der Besprechung eingegangen.

Ob die α_1 -Lipoproteidfraktion und der Unterstand entsprechend rein sind, kann

- a) immunoelektrophoretisch (Versuch 12) und
- b) im Senkungstest (Versuch 6) nachgewiesen werden.

6. Versuch: a). Anreicherung und Reinigung des Proinhibitors und Entfernung des Proinhibitors aus dem Unterstand durch Ultrazentrifugation.

Mischserum von 10 gesunden Spendern beliebiger Blutgruppen wurde nach Methode 10 aufgearbeitet. Um zu prüfen, wieweit es gelungen war, das Proinhibitor-Enzym-System zu trennen, wurden alle Fraktionen ausgetestet. Gleichzeitig wurde untersucht, wieviel Enzym mit den Fraktionen verloren geht, die verworfen werden.

I. Nach der Zentrifugation im Rotor Nr. 30 wurden Proben aus A, B und C, die 4,0, 6,1 und 6,8% Protein enthielten, dialysiert. Von jeder Fraktion wurden 0,7 ml inkubiert und weitere 0,7 ml zur Kontrolle bei 4° aufbewahrt.

Fraktion	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
A-K	50	-
A	2	96
B-K	50	-
B	40	20
C-K	50	-
C	51	-

Tab. 6: Nachweis von Enzym bzw. Proinhibitor in den bei der Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen. A, B und C.

Ergebnis: A und B enthalten Proinhibitor und Enzym.
C ist proinhibitorfrei.

II. Um den Proinhibitor aus B rein zu gewinnen, wurde dieses im Rotor Nr. 50 erneut zentrifugiert. Von B1, B2 und B3, deren Proteingehalt 1,4, 4,2 und 7,3% betrug, wurden ebenfalls nach der Dialyse 0,7 ml inkubiert und ausgetestet. Kontrollen wurden bei 4° aufbewahrt.

Fraktion	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
B1-K	50	-
B1	0	100
B2-K	50	-
B2	29	42
B3-K	50	-
B3	50	-

Tab. 7: Gewinnung einer proinhibitorfreien Fraktion B3 aus B.

Ergebnis: B1 und B2 enthalten Proinhibitor und Enzym.
B3 ist proinhibitorfrei. Mit B2, das verworfen wurde, geht ein Teil des Hemmsystems verloren.

III. A wurde zur Gewinnung des Proinhibitors bei verschiedener Dichte mehrmals zentrifugiert. Der Proteingehalt von A2 betrug 4,8%, von A2b 5,0%, von A2a 1,5%, von A2bII 4,5%, von A2bI 1,0%, von A2aII 1,1% und von α_1 -LP 4,0%.

Nach der Dialyse wurden 0,7 ml dieser Lösungen, von α_1 -LP jedoch nur 0,3 ml, denen 0,4 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung zugesetzt wurden, inkubiert und ausgetestet. Proben für Kontrollansätze standen bei 4°.

Die Fraktion mit den α_2 - und β -Lipoproteiden und den Chylomikronen wurde ohne Austestung verworfen, da sie weder Enzym noch Proinhibitor enthält (16).

Fraktion	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
A2-K	50	-
A2	2	96
A2b-K	50	-
A2b	38	24
A2a-K	50	-
A2a	2	96
A2bII-K	50	-
A2bII	49	2
A2bI-K	50	-
A2bI	14	72
A2aII-K	50	-
A2aII	0	100
α_1 -LP-K	50	-
α_1 -LP	48	4

Tab.8: Gewinnung einer proinhibitorfreien Fraktion A2bII aus A und Reindarstellung des Proinhibitors (α_1 -LP).

Ergebnis: A2 und A2b enthalten Enzym und Proinhibitor. Der Proinhibitorgehalt nimmt von A2 nach A2b ab.

A2bII ist proinhibitorfrei.

Während A2a noch Proinhibitor und Enzym enthält, ist A2aI (α_1 -LP) frei von Enzym.

A2aII und A2bI, die verworfen werden, enthalten Enzym und Proinhibitor, die verloren gehen.

b) Nachweis des Enzyms in den Unterständen A2bII, B3 und C.

Durch Ultrazentrifugation wurden aus A2bII, B3 und C die α_1 -Lipoproteide und damit der Proinhibitor entfernt.

Um nachzuweisen, daß die Fraktionen noch Enzym enthalten, wurden Proben daraus mit α_1 -Lipoproteiden gemeinsam inkubiert. Gegenüber einem Kontrollansatz (Methode 6) mußte die BKS im Senkungsansatz gehemmt sein.

Es ist günstig, die α_1 -Lipoproteide ungefähr in dem Verhältnis einzusetzen, dem ihre Konzentration im Serum entspricht (siehe Versuch 11). In einem ml Serum kommen normalerweise 3,0 - 5,3 mg α_1 -Lipoproteide vor (35). Der Lipoidanteil beträgt dabei 53% (36). Demnach enthält 1 ml α_1 -Lipoproteidpräparat, dessen Proteinanteil 4% ausmacht, etwas mehr als 80 mg α_1 -Lipoproteide. Die gewünschte Konzentration wird also erreicht oder knapp übertroffen, wenn von der etwa 8,5igen α_1 -Lipoproteidfraktion 0,05 bis maximal 0,1 ml zusammen mit der enzymhaltigen Fraktion inkubiert werden.

A2bII, B3 und C wurden eingeengt, bis der Proteingehalt 11% betrug. Von jeder Fraktion wurden 0,65 ml mit 0,05 ml α_1 -LP, dessen Proteinanteil mit 3,8% festgestellt wurde, vermischt und inkubiert. Zur Kontrolle wurden α_1 -LP und A2bII bzw. B3 und C auch getrennt der Temperatur von 37° ausgesetzt.

Fraktion mit α_1 -LP	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
-		
A2bII-K	50	-
A2bII	25	50
B3-K	50	-
B3	35	30
C-K	50	-
C	24	52

Tab. 9: Nachweis enzymatischer Aktivität in den Fraktionen

A2bII, B3 und C.

Ergebnis: A2bII, B3 und C enthalten Enzym; denn aus α_1 -LP wird bei der Inkubation Senkungsinhibitor freigesetzt.

Ähnliche Ergebnisse wurden noch in drei weiteren Versuchen erzielt, während die BKS in 5 Fällen nicht gehemmt war, auch nicht, nachdem A2bII, B3 bzw. C in höherer Konzentration mit α_1 -LP inkubiert worden waren.

Dieselben Gründe, die nach dem 5. Versuch für das Fehlen der Hemmwirkung verantwortlich gemacht wurden, gelten mit einer Ausnahme auch dafür, daß der Enzymnachweis in A2bII, B3 und C in einem Teil der Versuche mißlungen ist. Es muß angenommen werden, daß der Proinhibitorgehalt im Senkungsansatz ausreichend war.

7. Versuch: a) Anreicherung des Enzyms durch Aussalzung mit Ammoniumsulfatlösung (Methode 12).

Zur Anreicherung des Enzyms und, soweit möglich, zur Verminderung des Albumingehalts wurden A2bII, B3 und C mit Ammoniumsulfatlösung ausgesalzen. Die Fraktionen A2bII-N₁, A2bII-N₂, A2bII-N₃, B3-N₂ und C-N₂ wurden so behandelt, daß sie nach der Dialyse 5% Protein enthielten. 0,65 ml von jeder Fraktion wurden mit 0,05 ml α_1 -LP gemeinsam und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert. Der Proteinanteil der α_1 -Lipoproteidfraktion betrug 3,9%.

Fraktion mit α_1 -LP	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
A2bII-N ₁ -K	70/110	50	-
A2bII-N ₁	60/ 98	42	16
A2bII-N ₂ -K	95/121	50	-
A2bII-N ₂	2/ 10	0	100
A2bII-N ₃ -K	65/105	50	-
A2bII-N ₃	72/110	55	-
B3-N ₂ -K	95/124	50	-
B3-N ₂	15/ 42	8	84

C-N ₂ -K	81/118	50	-
C-N ₂	78/120	47	6

Tab. 10: Vergleich der enzymatischen Aktivität in den durch Aussalzen von A2bII, B3 und C mit Ammoniumsulfat gewonnenen Fraktionen.

Ergebnis: Die Fraktionen A2bII-N₂ und B3-N₂ enthalten Enzym. Auch A2bII-N₁ setzt aus α_1 -LP während der Inkubation etwas Inhibitor frei, während C-N₂ und A2bII-N₃ dies nicht oder kaum vermögen.

B3-N₁, B3-N₃, C-N₁ und C-N₃ verhielten sich wie A2bII-N₃ und wurden deswegen nicht in die Tabelle aufgenommen.

A2bII-N₂ war ohne Ausnahme in der Lage, bei gemeinsamer Inkubation mit α_1 -LP die BKS im Senkungsansatz zu blockieren.

B3-N₂ zeigte immer eine etwas schwächere Inhibitorwirkung.

Bei C-N₂ war eine solche nur in 3 Versuchen feststellbar, in 5 Versuchen gelang es nicht, mit C-N₂ aus α_1 -LP Inhibitor freizusetzen.

b) Prüfung der enzymatischen Aktivität in N₂ aus A2bII und B3.

Das Enzym scheint in A2bII und B3 in höherer Konzentration vorzuliegen als in C. Deswegen wurden die ersten beiden Fraktionen vor dem Aussalzen zusammengegeben. Da die Ausbeute aus C so unbefriedigend war, wurde es vorerst verworfen.

N₂ aus A2bII und B3 wurde wie beschrieben hergestellt und auf seinen Enzymgehalt untersucht. Dazu wurde es in steigender Konzentration mit jeweils 0,1 ml einer α_1 -LP-Fraktion, deren Proteinanteil 3,5% betrug, inkubiert und anschließend ausgetestet. Zur Kontrolle wurden Senkungsansätze mit denselben Mengen N₂ und α_1 -LP hergestellt, wobei aber N₂ und α_1 -LP getrennt inkubiert worden waren.

Menge N ₂ im Senkungs- ansatz (mg)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
1,5	47	6
3,6	46	8

7,3	44	12
14,6	37	26
21,9	10	80
29,2	6	88
36,5	2	96
43,8	1	98

Tab. 11: Abhängigkeit der Inhibitorwirkung des inkubierten N_2 von seiner Konzentration im Senkungsansatz.

In einem Koordinatensystem wurden auf der Abszisse die Mengen an N_2 in mg und auf der Ordinate die Hemmung in % eingetragen (Abb. 5, Seite 39).

Ergebnis: Aus mehreren Versuchen geht hervor, daß 18 ± 3 mg N_2 in der Lage sind, aus 0,1 ml einer α_1 -Lipoproteidlösung, deren Proteinanteil 3,5% beträgt, soviel Inhibitor freizusetzen, um die BKS im Senkungsansatz um 50% zu hemmen.

Nachdem es damit gelungen war, eine proinhibitorfreie enzymhaltige Fraktion herzustellen, wurde geprüft, welchen weiteren Belastungen das Enzym in N_2 ausgesetzt werden kann.

8. Versuch: Beeinflussung des Enzyms in N_2

- durch Dialyse von N_2 gegen Aqua bidest., Trisphosphatpuffer und Phosphatpuffer bei verschiedenem pH und
- durch Friertrocknung von N_2 .

N_2 wurde in Aqua bidest. gelöst, in 6 Proben P_1 - P_6 zu je 1,5 ml unterteilt und bei 4° folgendermaßen behandelt:

- P_1 wurde 36 Stunden gegen eine Außenphase, die 0,9% Kochsalz und 2,5 mg% Natriumbikarbonat enthielt, dialysiert.
- P_2 wurde 20 Stunden gegen Aqua bidest. und dann 16 Stunden wie P_1 dialysiert.
- P_3 wurde 20 Stunden gegen 0,05 M Phosphatpuffer von pH 7,4 und dann 16 Stunden wie P_1 dialysiert.
- P_4 wurde 20 Stunden gegen 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung von pH 4,85, 10 Stunden gegen eine Außenphase mit

0,9%igem Kochsalz und 25,0 mg% Natriumbikarbonat und dann 6 Stunden wie P_1 dialysiert.

P_5 wurde 20 Stunden gegen 0,4 M Trisphosphatpuffer von pH 7,5 und dann 16 Stunden wie P_1 dialysiert.

P_6 wurde friertrocknet, mit Aqua bidest. in 1,5 ml gelöst und 20 Stunden wie P_1 dialysiert.

Die Proben enthielten $2,8 \pm 0,15\%$ Protein. 0,65 ml wurden zusammen mit 0,05 ml α_1 -LP und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert. Der Proteinanteil der α_1 -Lipoproteidfraktion betrug 3,8%.

Probe mit α_1 -LP	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
P_1 -K	90/119	50	-
P_1	30/ 61	18	64
P_2 -K	90/125	50	-
P_2	28/ 55	17	66
P_3 -K	85/120	50	-
P_3	30/ 63	19	62
P_4 -K	92/120	50	-
P_4	61/ 92	36	28
P_5 -K	89/120	50	-
P_5	33/ 67	20	60
P_6 -K	89/119	50	-
P_6	31/ 61	18	64

Tab. 12: Einfluß der Dialyse gegen Aqua bidest. (P_2), Phosphatpuffer bei verschiedenem pH (P_3 und P_4), Trisphosphatpuffer (P_5) und der Friertrocknung (P_6) auf das Enzym in N_2 .

Ergebnis: Das Enzym in N_2 wird nicht inaktiviert

- a) durch Dialyse von N_2 gegen Aqua bidest.,
- b) durch Zugabe von Tris- oder Phosphationen zu N_2 und
- c) durch Friertrocknung von N_2 .

Es wird teilweise irreversibel geschädigt, wenn N_2 längere Zeit bei niedrigem pH gehalten wird.

Da das Enzym in N_2 weder durch längeren Aufenthalt in einem Milieu mit niedriger Ionenstärke noch durch Friertrocknung geschädigt wird, wurde versucht, N_2 durch Säulenchromatographie weiter aufzutrennen.

9. Versuch: Säulenchromatographie.

a) Fraktionierung von N_2 über DEAE-Cellulose (Methode 13).

N_2 wurde wie beschrieben über DEAE-Cellulose aufgetrennt. Um eine Schädigung des Enzyms zu vermeiden, wurde zur Elution der Proteine ein Trisphosphatpuffer, dessen pH-Wert 7,5 betrug, bei steigender Ionenstärke verwendet. Zweimal wurde N_2 auf diese Weise chromatographiert, ohne daß in einer der gewonnenen Fraktionen enzymatische Aktivität gefunden wurde. Zur Klärung der Frage, ob überhaupt aktives Enzym in ausreichender Konzentration mit dem verwendeten Puffersystem aus der DEAE-Cellulose eluiert werden kann, wurde das Gesamteluat 20 Stunden bei 4° gegen Aqua bidest. dialysiert und friergetrocknet. Das gewonnene Präparat wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und wie beschrieben 12 Stunden dialysiert. Der Proteingehalt des säulenchromatographierten N_2 = N_2S betrug 3,4%. 0,6 ml N_2S wurden zusammen mit 0,1 ml α_1 -LP und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert. Zum Vergleich wurde in der Tabelle 13 die Hemmung der BKS angegeben, die durch Einsetzen von 0,6 ml der 2,9%igen Ausgangssubstanz N_2 anstelle des N_2S zustandekam. N_2 , das im Eisbad aufbewahrt worden war, wurde vor Verwendung 20 Stunden dialysiert.

Probe mit α_1 -LP	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
N_2S -K	57/110	50	—
N_2S	52/103	45	10
N_2 -K	53/110	50	—
N_2	6/ 22	6	88

Tab. 13: Einfluß der Fraktionierung von N_2 über DEAE-Cellulose

auf die enzymatische Aktivität in N_2 .

Ergebnis: Das Enzym wird

- a) während der Eluation auf der Säule irreversibel geschädigt oder
- b) mit dem verwendeten Puffersystem nicht aus der DEAE-Cellulose herausgelöst.

b) Fraktionierung von N_2 über Sephadex G 200 (Methode 14).

N_2 wurde über Sephadex G 200 aufgetrennt. Auf die Säule wurden 14 ml der 5%igen Proteinlösung aufgetragen. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen, deren Volumina 7 ml betrugen, wurden bei 280 $m\mu$ gemessen.

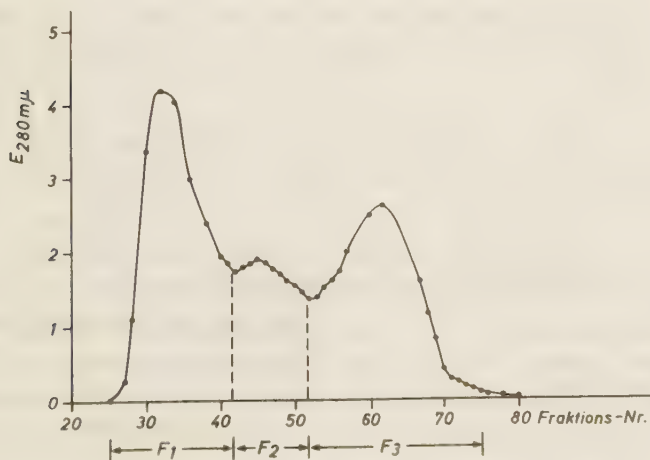


Abb. 3: Auftrennung von N_2 über Sephadex G 200.

Das Eluat wurde in 3 Fraktionen F_1 , F_2 und F_3 unterteilt (Abb. 3). Diese wurden friergetrocknet, in wenig Aqua bidest. gelöst und 15 Stunden bei 4° gegen eine Außenphase mit 0,9% Kochsalz und 2,5 mg% Natriumbikarbonat dialysiert. F_1 und F_3 wurden mit 0,9%iger Kochsalzlösung so verdünnt, daß sie wie F_2 3,1% Protein enthielten.

Zur Austestung wurden 0,6 ml einer jeden Fraktion zusammen mit 0,1 ml α_1 -LP und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert.

Probe mit α_1 -LP	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
F ₁ -K	113/124	-	-
F ₁	115/125	-	-
F ₂ -K	60/100	50	-
F ₂	40/ 73	32	36
F ₃ -K	42/ 80	50	-
F ₃	4/ 12	6	88

Tab. 14: Vergleich der enzymatischen Aktivität in den durch Fraktionierung von N₂ über Sephadex G 200 gewonnenen Fraktionen F₁, F₂ und F₃.

Ergebnis: Enzymatisch aktiv sind die Fraktionen F₂ und F₃. Das Enzym ist in F₃ in höherer Konzentration enthalten als in F₂.

c) Anreicherung des Enzyms in einer Fraktion F.

N₂ wurde über Sephadex G 200 chromatographiert. Auf die Säule aufgetragen wurden 17 ml N₂ mit einem Proteingehalt von 4,5%. Die einzelnen Fraktionen, deren Extinktion bei 280 m μ gemessen wurde, hatten Volumina von 9,5 ml (Abb. 4, Seite 37).

Zusammengegeben wurden folgende Fraktionen:

Nr. 38 - 40 als Fa	Nr. 47 - 49 als Fd
Nr. 41 - 43 als Fb	Nr. 50 - 52 als Fe
Nr. 44 - 46 als Fc	Nr. 53 - 55 als Ff

Fa bis Ff wurden friergetrocknet, in wenig Aqua bidest. gelöst und 18 Stunden bei 4° gegen eine Außenphase mit 0,9% Kochsalz und 2,5 mg% Natriumbikarbonat dialysiert.

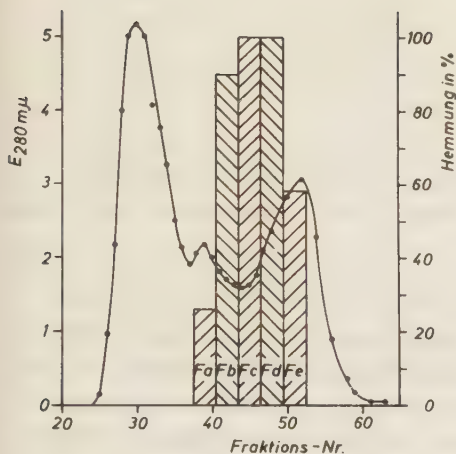


Abb. 4: Auftrennung von N_2 über Sephadex G 200 und Nachweis der enzymatischen Aktivität. Die prozentuale Hemmung der BKS ist schraffiert eingetragen.

Der Proteingehalt betrug in

Fa 2,3% Fd 2,9%
 Fb 2,0% Fe 4,3% und
 Fc 1,7% Ff 3,8%

0,6 ml dieser Fraktionen wurden mit 0,1 ml α_1 -LP zusammen und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert. Der Proteinanteil der α_1 -Lipoproteidfraktion machte 3,6% aus. Zur Austestung wurden die Senkungsansätze hergestellt.

Probe mit α_1 -LP	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
Fa-K	55/102	50	-
Fa	40/ 78	37	26
Fb-K	39/ 77	50	-
Fb	4/ 10	5	90
Fc-K	36/ 74	50	-
Fc	0/ 0	0	100
Fd-K	36/ 67	50	-
Fd	0/ 1	0	100

Fe-K	33/ 71	50	-
Fe	12/ 36	21	58
Ff-K	40/ 78	50	-
Ff	39/ 80	45	-

Tab. 15: Vergleich der enzymatischen Aktivität in den durch Fraktionierung von N_2 über Sephadex G 200 gewonnenen Fraktionen Fa, Fb, Fc, Fd, Fe und Ff.

Ergebnis: Die enzymatische Aktivität ist am höchsten in Fc, gefolgt von Fd und Fb. Da der Proteingehalt in Fc am niedrigsten ist, ist hier das Enzym am stärksten angereichert. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses wurde für weitere Versuche nach der Chromatographie von N_2 über Sephadex G 200 eine enzymhaltige Fraktion F gewonnen, die sich aus Fb, Fc, Fd und den 2 nächstliegenden Röhrchen zusammensetzte.

d) Prüfung der enzymatischen Aktivität in F.

Nach der Auftrennung von N_2 über Sephadex G 200 wurde in Anlehnung an Versuch 5c die enzymhaltige Fraktion F gewonnen. Auf die Säule waren 680 mg Protein als N_2 aufgetragen worden, wovon F noch etwa 190 mg enthielt. F wurde friergetrocknet, in Aqua bidest. gelöst und dann 16 Stunden bei 4° gegen eine Außenphase mit 0,9% Kochsalz und 2,5 mg% Natriumbikarbonat dialysiert. Der Proteingehalt betrug darnach 4,2%.

Steigende Mengen F wurden zusammen mit 0,1 ml α_1 -LP und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert.

Der Proteinanteil von α_1 -LP betrug 3,7%.

Menge an F im Senkungsansatz (mg)	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
1,3-K	40/78	50	-
1,3	40/77	50	-
3,4-K	36/78	50	-
3,4	33/67	43	14
6,4-K	35/70	50	-
6,4	22/50	32	36

12,6-K	35/70	50	-
12,6	3/ 7	4	92
18,9-K	35/68	50	-
18,9	0/ 2	1	98
25,2-K	28/60	50	-
25,2	0/ 0	0	100

Tab. 16: Die Abhängigkeit der Inhibitorwirkung des inkubierten F von seiner Konzentration im Senkungsansatz.

In Abb. 5 wurden auf der Ordinate die Hemmung der BKS in % und auf der Abszisse die Menge F im Senkungsansatz in mg eingetragen. Zum Vergleich wurden auch die Ergebnisse des Versuches 7b (Tab. 11) eingezeichnet.

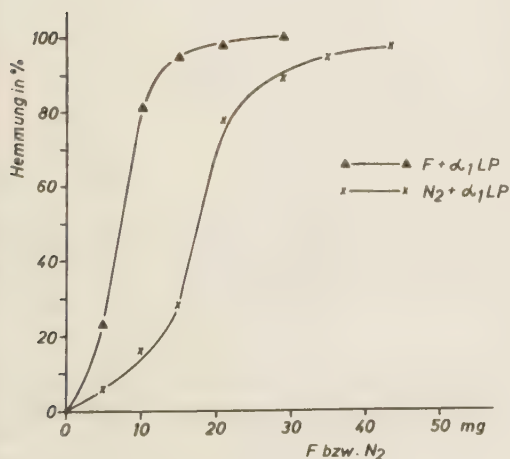


Abb. 5: Vergleich der enzymatischen Aktivität in N₂ und F.

Ergebnis: Aus 4 Versuchen ergab sich, daß 7 ± 2 mg F aus 0,1 ml α_1 -LP (Proteingehalt 3,7%) soviel Inhibitor freisetzen, daß die BKS um 50% gehemmt wird.

Das Enzym in F ist gegenüber N₂ um das dreifache angereichert.

Um zu prüfen, ob die Inkubationszeit von 7 Stunden nicht verkürzt werden kann, wurde F mit α_1 -LP verschieden lang inkubiert.

10. Versuch: Einfluß der Inkubationszeit auf Enzym und Substrat.

F wurde aus N_2 wie in Versuch 5c beschrieben hergestellt. Jeweils 0,3 ml F mit einem Proteingehalt von 8,7 mg wurden mit 0,05 ml α_1 -LP (Proteinanteil 4,2%) und zur Kontrolle getrennt davon verschieden lang zwischen 1 und 22 Stunden inkubiert.

Inkubationszeit von F und α_1 -LP (Stunden)	1-und 2-Std.- Senkungswert (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
1-K	25/57	50	-
1	23/52	46	8
3-K	25/54	50	-
3	13/29	27	46
5-K	26/58	50	-
5	6/13	12	76
7-K	24/56	50	-
7	4/ 8	7	86
9-K	24/53	50	-
9	2/ 4	4	92
22-K	19/44	50	-
22	0/ 0	0	100

Tab. 17: Die Abhängigkeit der Inhibitorwirkung des F von der Dauer der Inkubation.

In Abb. 6 wurde auf die Ordinate die Hemmung der BKS in % und auf der Abszisse die Inkubationszeit von F und α_1 -LP in Stunden eingetragen.

Zum Vergleich wurde auch das Ergebnis des 1. Versuches aufgeführt. (Abb. 6, Seite 41)

Ergebnis: Die Hemmung der BKS im Senkungsansatz mit F und α_1 -LP ist wie beim Mischserum von der Dauer der Inkubation abhängig. F und α_1 -LP müssen in der angegebenen Konzentration

etwa 1 Stunde länger, nämlich knapp 3 1/2 Stunden, inkubiert werden als Mischserum, um eine Hemmung von 50% zu erreichen. Noch erheblich größer ist der Zeitunterschied, wenn dabei eine 100%ige Hemmung erreicht werden soll.

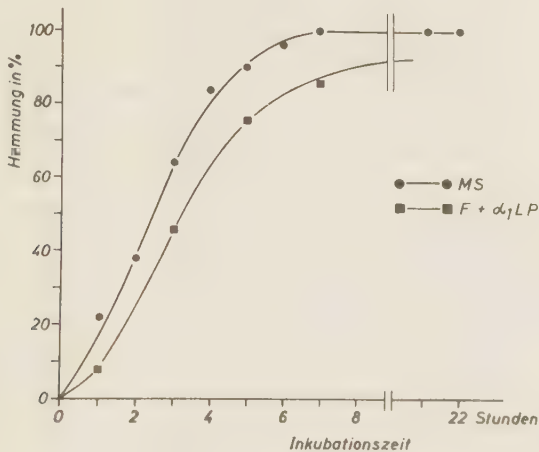


Abb. 6: Die Abhängigkeit der Hemmung der Blutkörperchensenkung von der Dauer der Inkubation von Mischserum und der Fraktion F mit Proinhibitor.

C. Versuche zur Charakterisierung des Enzyms.

Bei den bisherigen Versuchen zur Feststellung des Enzymgehalts einer Fraktion wurde α_1 -LP etwa in der Konzentration in den Senkungsansatz eingesetzt, in der es im Serum vorliegt. Im folgenden Versuch wird gezeigt, daß diese Konzentration optimal ist.

11. Versuch: Einfluß einer steigenden Substratmenge auf das Enzym in F bei gleicher Enzymkonzentration.

F wurde aus N_2 wie in Versuch 5c hergestellt. Es wurde friertrocknet, in wenig Aqua bidest. gelöst und wie beschrieben

dialysiert.

Jeweils 0,4 ml F mit einem Proteingehalt von 10 mg wurden zusammen mit steigenden Mengen α_1 -LP und zur Kontrolle getrennt davon inkubiert. Der Proteinanteil der α_1 -Lipoproteidfraction betrug 3,8%.

Menge α_1 -LP im Senkungsansatz (mg)	1-und 2-Std. Senkungswert- (mm)	50 mm-Wert	Hemmung der BKS (%)
0,88-K	49/80	50	-
0,88	22/48	22	56
2,64-K	47/84	50	-
2,64	4/10	5	90
4,42-K	47/89	50	-
4,42	4/ 9	4	92
8,84-K	50/90	50	-
8,84	9/20	9	82
13,26-K	53/93	50	-
13,26	20/43	18	64
17,68-K	65/103	50	-
17,68	32/ 84	25	50
26,52-K	65/112	50	-
26,52	59/105	46	8

Tab. 18: Die Abhängigkeit der Inhibitorwirkung des F von der Substratkonzentration.

In Abb. 7 wurden auf die Ordinate die Hemmung der BKS in % und auf die Abszisse die eingesetzten Mengen α_1 -LP eingetragen (Abb. 7, Seite 43).

Ergebnis: Die Hemmung der BKS im Senkungsansatz wird geringer, je mehr Substrat zur gleichen Menge der enzymhaltigen Fraktion F gegeben wird. Um eine optimale Hemmung zu erreichen, müssen 0,03 - 0,07 ml α_1 -LP, dessen Proteinanteil 3,8% beträgt, mit 10 mg der Fraktion F ausgetestet werden. Wenn das

Substrat in höherer Konzentration eingesetzt wird, wird die Hemmung der BKS abgeschwächt und anschließend aufgehoben. Wegen der geringen Ausbeute an α_1 -LP bei der Aufarbeitung von Mischserum ist es günstig, daß es in so geringer Konzentration im Senkungstest verwendet werden muß.

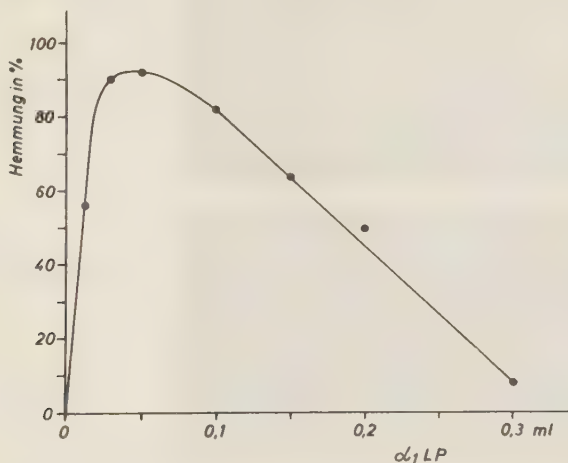


Abb. 7: Die Abhängigkeit der Hemmung der Blutkörperchensenkung von der Substratkonzentration.

Um zu prüfen, ob

- a) die Fraktion A2bII, B3, C, N₂ und F frei von α_1 -Lipoproteid und
- b) die α_1 -Lipoproteidfraktion mit anderen Proteinen verunreinigt waren, wurde eine Immunelektrophorese durchgeführt.

In den folgenden Abbildungen sind einige der dabei erhaltenen Bilder wiedergegeben.

12. Versuch: Immunelektrophoretische Untersuchungen der Fraktionen A2bII-N₂, B3-N₂, A2bII-F, B3-F, α_1 -LP und von Mischserum mit Antihumenserum vom Kaninchen.



Abb. 8

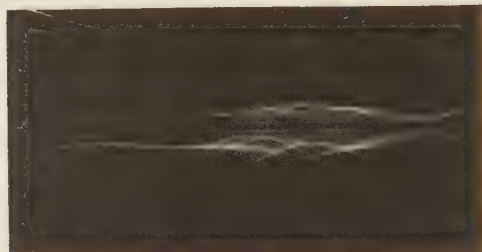


Abb. 9

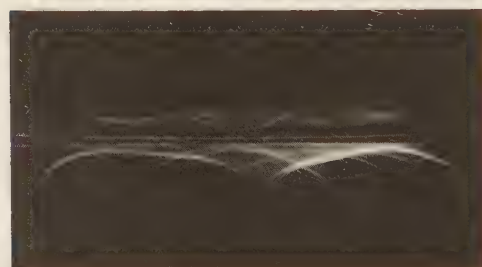


Abb. 10

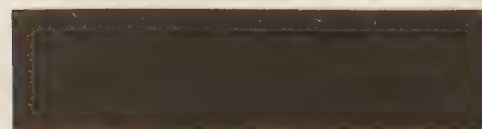


Abb. 11

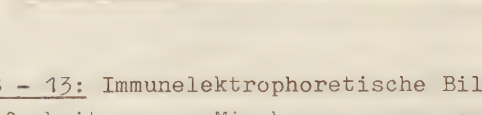


Abb. 12

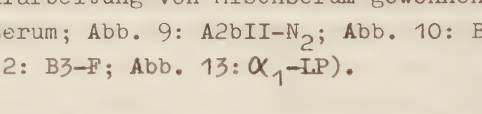


Abb. 13

Abb. 8 - 13: Immunelektrophoretische Bilder einiger der bei der Aufarbeitung von Mischserum gewonnenen Fraktionen (Abb. 8: Mischserum; Abb. 9: A2bII-N₂; Abb. 10: B3-N₂; Abb. 11: A2bII-F; Abb. 12: B3-F; Abb. 13: α_1 -LP).

Abbildung 8 zeigt das immunelektrophoretische Bild von Mischserum.

Aus den Abbildungen 9 und 10 geht hervor, daß A2bII-N₂ und B3-N₂ frei von α_1 -Lipoproteiden sind. Diese konnten auch nicht mit Anti- α_1 -Lipoproteidserum nachgewiesen werden. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Bilder der enzymhaltigen Fraktionen F aus A2bII und B3, wobei die Anzahl verschiedener

Proteine in der Fraktion F aus A2bII geringer ist als in der Fraktion F aus B3.

Nach Abbildung 13 enthält α_1 -LP noch α_2 - und β -Lipoproteide. Diese stammen aus der Fraktion B1, die vor der Gewinnung von α_1 -LP zur Fraktion A2a (Schema Seite 11) gegeben wird. Sie lassen sich entfernen, wenn B1 nicht zu A2a gegeben wird, sondern mit A dialysiert und verarbeitet wird. Wegen des damit verbundenen Zeitverlustes und wegen der fehlenden Auswirkungen auf den Test wurde auf diese Maßnahme bei einem Großteil der Versuche verzichtet.

Besprechung

Durch Ultrazentrifugation von Mischserum bei erhöhter Dichte gelingt es, das Proinhibitor-Enzym-System, das während der Inkubation den Senkungsinhibitor liefert, in eine Substrat- und eine Enzymfraktion zu trennen. Mittels Ammoniumsulfatfällung und der Chromatographie über Sephadex G 200 ist es möglich, das Enzym in einer Fraktion anzureichern. Ein Vergleich der Ergebnisse in den Abbildungen 5 und 1 zeigt, daß 12 mg F, die mit 4-6 mg α_1 -LP inkubiert werden, die BKS genauso zu hemmen vermögen wie Mischserum, dessen Proteingehalt ungefähr 55 mg beträgt.

Über das genaue Maß der Anreicherung ist aber eine Angabe vorerst nicht möglich; denn der Senkungstest, der die Hemmung der BKS anzeigt, ist nicht nur abhängig von den Mengen an Enzym und Proinhibitor, er wird auch durch Albumin (12) und die Agglomerine (Versuch 3) beeinflusst: Albumin vermindert im Senkungsansatz die durch den Inhibitor verursachte Hemmung oder hebt sie ganz auf, falls die Konzentration hoch genug ist. Ähnlich wird die Hemmung der BKS durch den Inhibitor eingeschränkt, wenn im Senkungsansatz vermehrt Agglomerine vorhanden sind.

Der Test ermöglicht es demnach nicht, eine Enzymeinheit zu definieren, solange Albumin und/oder Agglomerine in den auszutestenden Fraktionen vorhanden sind. Diese beiden Faktoren dürften z.T. erklären, daß bei mehreren Versuchen in U (Versuch 5), A2bII, B3, C (Versuch 6) und C-N₂ (Versuch 7) kein Enzym nachgewiesen werden konnte, obwohl diese Fraktionen Enzym enthielten, wie die weitere Aufarbeitung bewies. Das Enzym scheint nicht ausgereicht zu haben, um in Gegenwart von Albumin und Agglomerin genügend Inhibitor zur Blockierung der Senkung freizusetzen. Weiter besteht auch die Möglichkeit, daß den genannten Fraktionen bei der Inkubation zuviel Proinhibitor zugesetzt und so eine Substrathemmung herbeigeführt wurde.

Bei der Trennung des Proinhibitor-Enzym-Systems mußten Fraktionen verworfen werden (B2, A2bI, A2aII), die das gesamte Hemmsystem enthielten. Nur so war es möglich, einen proinhibitorfreien Unterstand zu gewinnen, der zur Anreicherung des Enzyms weiterverarbeitet wurde. Dieser unvermeidbare Enzymverlust dürfte neben der nachteiligen Wirkung des Albumins und der Agglomerine eine weitere Ursache für das Versagen des Testes in den beschriebenen Fällen sein. Zu klären ist ferner, ob durch Zugabe von Kaliumbromid zum Mischserum (Tab. 4, Seite 22) das Enzym oder der Proinhibitor beschädigt wird.

Der Vorteil des Senkungstestes besteht darin, daß er ohne großen Aufwand schnell durchgeführt werden kann; die genannten Unsicherheiten schränken seinen Wert jedoch ein. Als erheblicher Nachteil erweist sich weiter, daß der Test verhältnismäßig große Mengen an enzymhaltigen Präparat verbraucht. Da die Aufarbeitung des Mischserums jeweils 2 Wochen dauert und die Ausbeute gering ist, erschwert der Senkungstest die Isolierung des Enzyms erheblich.

Mehrere Gründe sprechen also für die Notwendigkeit, den Test zu ändern. Aussichtsreich erscheint es, die Wirkung des Reaktionsprodukts quantitativ zu bestimmen. Folgende Möglichkeiten bieten sich an:

1. Erythrozyten im Senkungsansatz können etwa die 10fache Menge Lysolecithin binden, die zur Hemmung der BKS erforderlich

(11) , bevor Hämolyse eintritt. Wenn folglich die Erythrozytenmenge, die bisher den Senkungsansätzen zugesetzt wurde, auf 1/20 vermindert und mit gleichbleibenden Mengen an enzymhaltigen Präparat und Proinhibitor inkubiert wird, besteht die Möglichkeit, daß die Erythrozyten durch das freigesetzte Lysolecithin hämolysiert werden. Vielleicht wird derselbe Effekt sogar erreicht, wenn alle Reaktionspartner im gleichen Verhältnis reduziert werden. Die eingetretene Hämolyse könnte photometrisch bestimmt und mit einem Kontrollansatz, der außer Erythrozyten nur physiologische Kochsalzlösung enthält, verglichen werden.

2. Die mechanische Resistenz der Erythrozyten wird bei der Inkubation mit dem Proinhibitor-Enzym-System herabgesetzt (37). Diese gegenüber einem Kontrollansatz mit physiologischer Kochsalzlösung verminderte Resistenz könnte festgestellt werden; dazu läßt man die Ansätze mit geschliffenen Quarzkugeln 1-2 Stunden rotieren. Die bei dieser mechanischen Belastung auftretende Hämolyse gibt ein Maß für die Resistenz der Erythrozyten. Die Hämolyse ist in den Ansätzen mit Lysolecithin verstärkt (38).

3. Die Lysolecithinbildung ist an die Aktivität des Komplementsystems gekoppelt (37). Dieses besteht aus mindestens 10 Komponenten, wobei die Reaktion des letzten die Auflösung der Zelle bewirkt (39). Wird anstelle dieses Komplementfaktors unser enzymhaltiges Präparat eingesetzt, läuft die Immunhämolyse ebenfalls ab (40). Der Grad der Hämolyse wird photometrisch festgestellt. Besonders geeignet wäre hierbei eine kontinuierliche optische Registrierung (41).

4. Erythrozytenhämolysate verschiedener Spezies enthalten ein acylierendes System, das Monoacylphosphatide zu Diacylphosphatiden acyliert (42,43,44). Um einen spezifischen quantitativen Nachweis von Lysolecithin zu erhalten, wird Lysolecithin mit ^{14}C -Ölsäure acyliert und die Radioaktivität gemessen (45).

5. Lysolecithin und andere Phosphatide lassen sich quantitativ sehr genau bestimmen durch Kieselsäure-Papierchromatographie (46). Auf diese Weise wurde festgestellt, daß nach 4stündiger Inkubation von Serum bei 38° 10% des vorhandenen Lecithin um-

gewandelt wird (47).

Die vorgeschlagenen Tests liessen sich auch kombinieren.

Im Verlauf der letzten Jahre wurden im menschlichen Serum enzymatische Aktivitäten gefunden, die wie die Senkungslipase als Reaktionsprodukt Lysolecithin liefern. Im folgenden sind zwei Enzymsysteme angeführt, die möglicherweise mit der Senkungslipase in Beziehung stehen:

1. Glomset (51,52) gelang es, aus Plasma ein Enzym anzureichern, das Cholesterin mit einer Fettsäure verestert. Gleichzeitig wird aus Lecithin, das an die α_1 -Lipoproteidfraction gebunden ist, Lysolecithin gebildet. Dieses ist wie der Inhibitor im Plasma vermehrt nachweisbar. Das Enzym fällt wie die Senkungslipase zwischen 40 und 66%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat aus. Die Auftrennung über Sephadex G 200 läßt kaum einen Unterschied im Molekulargewicht erkennen. Das Wirkungsoptimum liegt zwischen pH 7,5 und pH 8,5. Gegen eine Identität sprechen die erfolgreiche Chromatographie der Acyltransferase über DEAE-Cellulose und die reversible Hemmung des Enzyms durch Gallensäure.

2. Wie bereits angeführt konnten Götze und Fischer (39) eine eiweißarme Fraction gewinnen, die bei der Immunhämolyse unter der Voraussetzung, daß die restlichen Komplementfaktoren vorhanden sind, die Auflösung der Zellen herbeiführt. Bei dieser Reaktion wird Lysolecithin ebenfalls vermehrt freigesetzt. Da die enzymatische Aktivität durch die Senkungslipase zu ersetzen ist (40), bestehen möglicherweise Zusammenhänge. Um dies zu klären, müßte festgestellt werden, ob die α_1 -Lipoproteide als Substrat für das Komplementsystem geeignet sind.

Über die biologische Bedeutung des Proinhibitor-Enzymsystems ist wenig bekannt. Bei der Inkubation in vitro liefert es Lysolecithin, das folgende Wirkungen aufweist:

1. In ausreichender Konzentration hämolysiert es Erythrozyten (50).
2. Es wirkt zytolysierend auf Mastzellen (51).
3. Es ist Endprodukt der Immunhämolyse (37,52).
4. Es steigert die Phagozytose (53).
5. Es setzt Histamin frei (54).

Albumin verhindert nicht nur die Hemmung der BKS durch Lysolecithin (11), es hebt auch dessen biologische Aktivität gegenüber Erythrozyten (13) und Mastzellen (55) auf. Es ist aber sicherlich nicht dafür verantwortlich, daß pathologische Seren eine beschleunigte BKS zeigen. Vielmehr wird Lysolecithin in vivo nur in geringer Menge gebildet oder so schnell auf- bzw. abgebaut, daß es die beschleunigte BKS pathologischer Seren nicht verhindert.

Verschiedene Untersuchungen sprechen für die zweite Vorstellung, daß Lysolecithin im Organismus schnell umgebaut wird:

1. Durch Injektion von Schlangengift-Phosphorlipase A entsteht im Serum von Kaninchen vermehrt Lysolecithin. Dieses verschwindet in kurzer Zeit aus dem Kreislauf (56).
2. Humanerythrozyten binden Lysolecithin, wenn sie mit lysolecithinreichem Plasma in Berührung kommen. Die Reaktion läuft innerhalb einer Minute ab (13). Das acylierende System, das in Erythrozytenlysaten nachgewiesen wurde, katalysiert folgende Reaktionen:

Lysolecithin + Fettsäure $\longrightarrow$ Lecithin

2 Lysolecithin $\longrightarrow$ Lecithin + Glycerylphosphorylcholin

Lysolecithin $\longrightarrow$ Glycerylphosphorylcholin + Fettsäure

Da in diesen Lysaten noch keine Phospholipase nachgewiesen wurde, ist es wahrscheinlich, daß das an den Erythrozyten gefundene Lysolecithin aus dem Serum stammt (42,43,44).

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dem Proinhibitor-Enzym-System neben der Freisetzung von Lysolecithin aus α_1 -Lipoproteiden noch eine andere Aufgabe zukommt.

Klinisch von Bedeutung ist, daß das Proinhibitor-Enzym-System bei verschiedenen Kranken in unterschiedlichem Maße ausgeprägt ist. Bei Krankheiten auf Grund einer Entzündung kommt es nach mehrstündiger Wärmebehandlung des Plasmas fast immer zu einer völligen Normalisierung einer beschleunigten Senkung. Daraus geht hervor, daß bei diesen Krankheiten sowohl der Proinhibitor als auch die Senkungslipase in ausreichender Konzentration im Plasma vorhanden sind. Bei Krankheiten malignen Ursprungs finden sich dagegen zahlreiche Fälle, bei denen die Wärmeinaktivierung nur geringe Ausmaße erreicht (57,58).

Zusammenfassung

1. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit in wärmeinkubierten Senkungsansätzen von Mischserum ist abhängig von der Inkubationsdauer und der Proteinkonzentration des Mischserums.
2. Das Proinhibitor-Enzym-System, das durch Freisetzung des Inhibitors die BKS hemmt, läßt sich durch Ultrazentrifugation von Mischserum bei erhöhter Dichte trennen. Der Proinhibitor befindet sich im Flotationsprodukt und das Enzym im Unterstand.
3. Beim Aussalzen des Unterstandes mit Ammoniumsulfatlösung wird das Enzym in der Fraktion nachgewiesen, die zwischen 40-58%iger Sättigung ausfällt.
4. Nach Auftrennung dieser enzymhaltigen Fraktion über DEAE-Cellulose wird im Senkungstest keine enzymatische Aktivität mehr gefunden. Dagegen wird durch Chromatographie über Sephadex G 200 eine Fraktion gewonnen, in der das Enzym angereichert ist.
5. Wenn gleiche Mengen einer enzymhaltigen Fraktion mit steigenden Mengen Proinhibitor inkubiert werden, wird in abnehmender Menge Inhibitor freigesetzt. Es liegt demnach eine Substrathemmung vor.
6. Das Enzym wird irreversibel geschädigt, wenn dies einige Zeit bei niedrigem pH verbleibt.
7. Albumin und Agglomerine wirken der Hemmung durch den Inhibitor entgegen; eine zuverlässige Angabe über das Maß der Anreicherung des Enzyms aus Mischserum ist deshalb zunächst nicht möglich, da der Gehalt an Albumin und Agglomerinen bei den wirksamen Enzymanreicherungen variiert.

Literaturverzeichnis

- 1) Nasse: Das Blut, Bonn (1836);
- 2) Hewson: Works ed. Gulliver, London (1846);
- 3) Fahraeus, R.: Acta med.scand. 55, 1 (1921);
- 4) Ruhenstroth-Bauer, G.: Acta haemat. 18, 98 (1921);
- 5) Ruhenstroth-Bauer, G.: Klin. Wschr. 43, 460 (1965);
- 6) Gordon, C.M. and Wardley, I.R.: Biochem.J. 37, 393 (1943);
- 7) Ruhenstroth-Bauer, G., Brittinger, G., Nass, G., Tautfest:
Klin. Wschr. 40, 12000 (1962);
- 8) Bergenhem, B.: Exp. Untersuchungen über Veränderungen des
Blutes in vitro, Kopenhagen (1939);
- 9) Ruhenstroth-Bauer, G.: Blut 5, 91 (1959);
- 10) Fahraeus, R.: Lancet 237, 630 (1939/II);
- 11) Schiebel, W.: Dissertation, München (1966);
- 12) Schiebel, W., Nass, G., Eulitz, M. und Ruhenstroth-Bauer, G.:
Hoppe-Seyler's Zeitschr.f.phys.Chemie 338, 198 (1964);
- 13) Klibansky, C., de Vries, A.: BBA 70, 176 (1963);
- 14) Chava Kirschmann, Sara Aloav and Andre de Vries: Tromb.
and Diath. Hematologica 5/6, 512 (1963);
- 15) Schiebel, W., Adlkofer, F., Ruhenstroth-Bauer, G.: Zeitschr.
f.Klin.Chemie, Heft 60 (1965);
- 16) Kayser, F.H., Nass, G., Ruhenstroth-Bauer, G.: Hoppe-Seyler's
Zeitschr.f.phys.Chemie 331, 95 (1963);
- 17) Ruhenstroth-Bauer, G.: VIII Kongress der Int.Gesellschaft
f.Haematol., Tokio 1960;
- 18) Schmidt, G.: Z.f.Immunitätsforschung 107, 341 (1950);
- 19) Schubert, R., Wiegandt, E.: Dtsch.med.Wschr. 70, 307 (1944);
- 20) Nass, G.: Dissertation, München 1960;
- 21) Westergren, A.: Ergebn.inn.Med. 26, 577 (1924);
- 22) B.R.Ray, E.O.Davison und H.L.Crespi: J.phys.Chemie 58, 841
(1942);
- 23) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
J.biol.Chemie 193, 265 (1951);
- 24) O.F. de Lalla u. J.W.Gofman: Methods biochem. Analysis 1,
459 (1954);
- 25) H.G. Kunkel, R.Trautmann: J.f.clin.Invest. 35, 641 (1956);
- 26) K.Heide, R.Schmidtberger u. G.Schwiek,: Behringwerk Mitt.
33, 96 (1957);

- 27) R.J.Havel, H.E.Eder u. J.H.Bragdon: J.clin.Invest. 34, (1945);
- 28) F.T.Lindgren, A.V.Nichols in F.W. Putnam: Plasmaproteine, Band II, S.4, Academic Press, New York (1960);
- 29) F.Peeton, P.Gerald: Clin.chim.Acta:10, 375 (1964);
- 30) Taylor, J.F. and Neurath, H.N.: The Proteins I, Seite 55 (1953);
- 31) Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D., Lieber, F.: J.am. Oil Chem. Soc. 40, 425 (1963);
- 32) Flodin, P.: Dextran Gels and their Application in Gelfiltration, Pharmacia, Uppsala (1962);
- 33) P.Graber, C.A.Williams: Biochim biophysica Acta 10, 193 (1953);
- 34) I.J.Scheidegger: Int.Arch.Allergy appl.Immunol. 103, (1955);
- 35) H.E.Schulze u. G.Schwiek: Behringwerk Mitt. 35, 57 (1958);
- 36) Korn: Methods Bioch.Analysis, Band VII, Seite 145;
- 37) Fischer, H., Haupt, I.: Z.f.Naturf. 16b, 321 (1961);
- 38) Schuboth, H., Po-Tun-Fok: Brit.I.haemat. im Druck;
- 39) Götze, O., Fischer, H.: Z.f.Klin.Chemie, Heft 6 (1965);
- 40) Fischer, H.: persönliche Mitteilung;
- 41) Siedentopf, H.G., Haupt, I.: Z.f.Naturf. 20b, 369 (1965);
- 42) Oliveira, M.M., Vaughan, M.: Fed.Proc. 11, 296 (1962);
- 43) Robertsen, A.F., Lands, W.E.: J.Lipid.Res. 5, 88 (1964);
- 44) Mulder, E., van den Berg, J.W., van Deenen, L.L.: BBA 106, 118 (1965);
- 45) Ferber, E., Haupt, I.: Z.f.Klin.Chemie, Heft 6 (1965);
- 46) Vogel, W.C., Zieve, L. Carleton, R.O.: The J.of Lab. and Clin. Med. 59, 335 (1962);
- 47) Vogel, W.C., Zieve, L.: Proc.Soc.exp.Biol.Med. 111, 538 (1962);
- 48) Glomset, J.A.: BBA 70, 389 (1964);
- 49) Glomset, J.A., Wright, J.L.: BBA 89, 266 (1964);
- 50) Kyes, P.: Berlin klin.Wschr. 40, 356 (1903);
- 51) Keller, R.: Helv.Physiol.Acta 22, C 24 (1964);
- 52) Haupt, I., Fischer, H.: X.Cong.Intern.Soc.Haematol., Stockholm K 66 (1964);
- 53) Burdzy, K., Munder, P.G., Fischer, H., Westphal, O.: Z.f. Naturf. 19b, 1118 (1964);
- 54) Middleton, E., Phillips, G.B.: J-Lab-Clin.Med. 64, 889 (1964);

- 55) Keller, R.: Path. Microbiol. 28, 185 (1965);
- 56) Klibansky, Ch., Condrea, E., de Vries, A.: Am. J. Physiol. 203,
114 (1962);
- 57) Ruhenstroth-Bauer, G.: Hippokrates 21, 829 (1961);
- 58) Groß, in Vorbereitung.

Lebenslauf

Am 14.12.1935 wurde ich in Attenzell als Sohn des Schreinermeisters Franz Adlkofer und seiner Frau Barbara, geb. Schmidt, geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Schambach, das Humanistische Gymnasium in Eichstätt und das Humanistische Gymnasium in Ingolstadt a.D., wo ich im Juni 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1957 bis Oktober 1960 war ich Soldat der Bundeswehr, aus der ich auf eigenen Wunsch entlassen wurde.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich an der Universität München Medizin zu studieren. Im April 1963 bestand ich das Physikum. Zur Zeit stehe ich im medizinischen Staatsexamen.

Im August 1962 heiratete ich Fräulein Margrit de Palacios.

Von November 1963 bis November 1965 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Biochemie in München an meiner Doktorarbeit.

